

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2005 年 9 月 1 日 (01.09.2005)

PCT

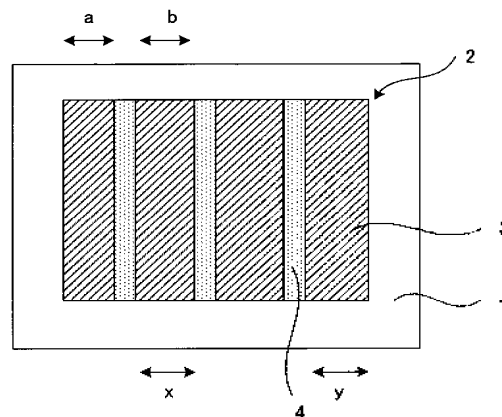
(10) 国際公開番号  
**WO 2005/080547 A1**

- (51) 国際特許分類: **C12M 3/00** [JP/JP]; 〒1628001 東京都新宿区市谷加賀町一丁目 1 番 1 号 Tokyo (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2005/002608
- (22) 国際出願日: 2005 年 2 月 18 日 (18.02.2005) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてののみ): 三宅 秀之 (MIYAKE, Hideyuki) [JP/JP]; 〒1628001 東京都新宿区市谷加賀町一丁目 1 番 1 号 大日本印刷株式会社内 Tokyo (JP). 服部 秀志 (HATTORI, Hideshi) [JP/JP]; 〒1628001 東京都新宿区市谷加賀町一丁目 1 番 1 号 大日本印刷株式会社内 Tokyo (JP). 小林 弘典 (KOBAYASHI, Hironori) [JP/JP]; 〒1628001 東京都新宿区市谷加賀町一丁目 1 番 1 号 大日本印刷株式会社内 Tokyo (JP). 田澤 秀胤 (TAZAWA, Hidetsugu) [JP/JP]; 〒1628001 東京都新宿区市谷加賀町一丁目 1 番 1 号 大日本印刷株式会社内 Tokyo (JP).
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願2004-043387 2004 年 2 月 19 日 (19.02.2004) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 大日本印刷株式会社 (DAI NIPPON PRINTING CO., LTD.)

[続葉有]

(54) Title: PATTERNING SUBSTRATE FOR CELL CULTURE

(54) 発明の名称: 細胞培養用パターンニング基板



(57) Abstract: A patterning substrate for cell culture that can realize efficiently arranging of cells in a regular fashion over a large area on a base material so as to attain forming of a tissue, etc. There is provided a patterning substrate for cell culture, comprising a base material and, superimposed thereon, a cell culture region being a region for cell incubation and including a cell adhesive layer having adherence to cells, characterized in that the cell culture region has cell adhesive parts wherein the cell adhesive layer is provided and a cell adhesion auxiliary part that is provided in patterned form and inhibits cell adhesion, and that the cell adhesion auxiliary part is provided so that at the time of sticking of cells to the cell adhesive parts, the cells on two cell adhesive parts adjacent to the cell adhesion auxiliary part can bind each other on the cell adhesion auxiliary part.

(57) 要約: 本発明は、基材上に大面積で、効率よく細胞を規則的に配列させることができ、組織等を形成することが可能な細胞培養用パターンニング基板を提供することを主目的としている。上記目的を達成するために、本発明は、

[続葉有]

WO 2005/080547 A1



(74) 代理人: 山下 昭彦, 外(YAMASHITA, Akihiko et al.);  
〒1040031 東京都中央区京橋一丁目 16 番 10 号  
オークビル京橋 4 階 東京セントラル特許事務所内  
Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が  
可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,  
BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,  
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,  
ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,  
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI,  
NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG,  
SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,  
VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護  
が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA,  
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ,  
BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE,  
BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU,  
IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),  
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,  
MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各 *PCT* ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

---

基材と、前記基材上に形成され、細胞を培養する領域であり、かつ細胞と接着性を有する細胞接着層を含有する細胞培養領域とを有する細胞培養用パターンニング基板であって、前記細胞培養領域は、前記細胞接着層が形成された細胞接着部と、パターン状に形成され、かつ細胞と接着することを阻害する細胞接着補助部とを有し、前記細胞接着補助部は、前記細胞接着部に細胞を付着させた際、前記細胞接着補助部に隣接する 2 つの前記細胞接着部上の細胞どうしが前記細胞接着補助部上で結合し得るように形成されていることを特徴とする細胞培養用パターンニング基板を提供する。

## 明 細 書

### 細胞培養用パターンニング基板

### 技術分野

[0001] 本発明は、例えば血管等の細胞の培養に用いられる細胞培養用パターンニング基板に関するものである。

### 背景技術

[0002] 現在、いろいろな動物や植物の細胞培養が行われており、また、新たな細胞の培養法が開発されている。細胞培養の技術は、細胞の生化学的現象や性質の解明、有用な物質の生産などの目的で利用されている。さらに、培養細胞を用いて、人工的に合成された薬剤の生理活性や毒性を調べる試みがなされている。

[0003] 一部の細胞、特に多くの動物細胞は、何かに接着して生育する接着依存性を有しており、生体外の浮遊状態では長期間生存することができない。このような接着依存性を有した細胞の培養には、細胞が接着するための担体が必要であり、一般的には、コラーゲンやフィブロネクチンなどの細胞接着性タンパク質を均一に塗布したプラスチック製の培養皿が用いられている。これらの細胞接着性タンパク質は、培養細胞に作用し、細胞の接着を容易にしたり、細胞の形態に影響を与えることが知られている。

[0004] 一方、培養細胞を基材上の微小な部分にのみ接着させ、配列させる技術が報告されている。このような技術により、培養細胞を人工臓器やバイオセンサ、バイオリアクターなどに応用することが可能になる。培養細胞を配列させる方法としては、細胞に対して接着の容易さが異なるような表面がパターンをなしているような基材を用い、この表面で細胞を培養し、細胞が接着するように加工した表面だけに細胞を接着させることによって細胞を配列させる方法がとられている。

[0005] 例えば、特許文献1には、回路状に神経細胞を増殖させるなどの目的で、静電荷パターンを形成させた電荷保持媒体を細胞培養に応用している。また、特許文献2では、細胞非接着性あるいは細胞接着性の光感受性親水性高分子をフォトリソグラフィ法によりパターンニングした表面上への培養細胞の配列を試みている。

[0006] さらに、特許文献3では、細胞の接着率や形態に影響を与えるコラーゲンなどの物質がパターンニングされた細胞培養用基材と、この基材をフォトリソグラフィ法によって作製する方法について開示している。このような基材の上で細胞を培養することによって、コラーゲンなどがパターンニングされた表面により多くの細胞を接着させ、細胞のパターンニングを実現している。

[0007] しかしながら、このような細胞の培養方法において、細胞培養パターンの面積が広い場合、細胞培養パターンの端部では、細胞を規則的に配列させることができるが、細胞培養パターンの中央部では、細胞の配列性が悪くなったり、細胞が接着しない場合等がある、という問題がある。また、一般的な細胞は、個々の細胞が形態変化をして組織を形成するものであり、このような組織を形成するように、上記の細胞培養パターン等で細胞培養をする場合、細胞との接着性を有する細胞接着部と、細胞と接着することを阻害する細胞接着阻害部との境界領域が細胞を刺激し、それにより細胞の形態変化が生じ、この形態変化が徐々に細胞培養パターンの中央部に伝播することが、非特許文献1等にも示されている。しかしながら、この細胞培養パターンは面積が広くなると、細胞の形態変化が中央部まで伝わりにくいため、中央部の細胞の形態変化が生じにくく、中央部では組織が形成されない、という問題があった。またさらに、このように細胞を播種して基板に接着させる際、細胞の接着に時間がかかる、という問題もあった。

[0008] 特許文献1:特開平2-245181号公報

特許文献2:特開平3-7576号公報

特許文献3:特開平5-176753号公報

非特許文献1:Spargo 他, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (1994) p.11070-

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0009] そこで、基材上に大面積で、効率よく細胞を規則的に配列させることができ、組織等を形成することが可能な細胞培養用パターンニング基板の提供が望まれている。

課題を解決するための手段

[0010] 本発明は、基材と、上記基材上に形成され、細胞を培養する領域であり、かつ細胞と接着性を有する細胞接着層を含有する細胞培養領域とを有する細胞培養用パターンニング基板であって、

上記細胞培養領域は、上記細胞接着層が形成された細胞接着部と、パターン状に形成され、かつ細胞と接着することを阻害する細胞接着補助部とを有し、上記細胞接着補助部は、上記細胞接着部に細胞を付着させた際、上記細胞接着補助部に隣接する2つの上記細胞接着部上の細胞どうしが、上記細胞接着補助部上で結合し得るように形成されていることを特徴とする細胞培養用パターンニング基板を提供する。

[0011] 本発明によれば、上記細胞培養領域中に、細胞接着補助部が形成されていることから、細胞接着部上に細胞が付着した場合、その細胞を活性化することができ、効率よく短時間で細胞を培養することができる。また、細胞接着補助部に挟まれた領域ごとに細胞の培養が行われることとなることから、細胞接着補助部がない状態で細胞培養領域全体に細胞を培養させる場合と比較して、境界領域から刺激を受ける細胞数を多くすることができる。これにより、細胞の配列性を良好なものとすることができ、またさらに、細胞の形態変化も均一に行うものとさせることができるのである。また、本発明においては、上記細胞接着補助部が、細胞接着層に細胞を付着させた場合、隣接する細胞接着部に付着された細胞同士の結合を阻害しないように形成されていることから、最終的に細胞培養領域全面の細胞が結合したものとすることができ、得られる組織等を大面積なものとすることができるのである。

[0012] 上記発明においては、上記細胞接着補助部が、上記細胞培養領域内でライン状に形成されているものとすることができる。この場合、上記細胞培養領域を形成する際の設計が容易となり、また細胞を付着させた際に細胞が規則的に配列しやすい、という利点を有する。

[0013] また、上記発明においては、上記細胞接着補助部と上記細胞接着部との境界が凹凸を有するパターン状に形成されているものとすることができる。このように凹凸を有するパターンに沿って細胞を付着させた場合、境界領域から細胞が感受する刺激が多くなり、細胞をより整列して配列させることができる。また、細胞の細胞接着部に対する接着性を活性なものとすることができることから、効率よく短時間で細胞を基板上

に接着させることが可能な細胞培養用パターンニング基板とすることができる。

- [0014] また、本発明は、基材と、上記基材上に形成され、細胞を培養する領域であり、かつ細胞と接着性を有する細胞接着層を含有する細胞培養領域とを有する細胞培養用パターンニング基板であって、

上記細胞接着層は、端部が凹凸を有するパターン状に形成されていることを特徴とする細胞培養用パターンニング基板を提供する。

- [0015] 本発明によれば、上記細胞接着層の端部が凹凸を有するパターン状に形成されていることから、細胞接着層上に細胞を付着させる際、境界領域から細胞が感受する刺激が多くなり、上記細胞接着層の端部に沿って、細胞をより整列して配列させることができる。また細胞の細胞接着部に対する接着性を活性なものとすることができることから、効率よく短時間で細胞を基板上に接着させることが可能な細胞培養用パターンニング基板とすることができる。

- [0016] 上記発明においては、上記凹凸の凹部端から凸部端までの距離が、上記細胞接着層上に細胞を付着させた際、細胞が直線的に整列するような大きさであることが好ましい。凹凸の大きさをこのようなものとするにより、良好に細胞を配列させることが可能となるからである。

- [0017] 上記発明においては、上記凹凸の凹部端から凸部端までの距離の平均が $0.5\mu\text{m}$ — $30\mu\text{m}$ の範囲内であることが好ましい。凹凸の大きさをこのような範囲とすることにより、細胞を良好に配列させることや、細胞を活性化させることができるからである。

#### 発明の効果

- [0018] 本発明によれば、細胞接着部上に細胞を付着させた際、その細胞を活性化することができ、効率よく短時間で広い面積に細胞を培養することが可能な細胞培養用パターンニング基板とすることができる。またこの際、細胞の配列性を良好なものとすることができ、細胞の形態変化も均一に行うものとすることができる、という効果も奏する。

#### 図面の簡単な説明

- [0019] [図1]本発明の細胞培養用パターンニング基板の一例を示す概略断面図である。  
[図2]本発明の細胞培養用パターンニング基板の他の例を示す概略断面図である。  
[図3]本発明の細胞培養用パターンニング基板の他の例を示す概略断面図である。

[図4]本発明の細胞培養用パターンニング基板の他の例を示す概略断面図である。

[図5]本発明の細胞培養用パターンニング基板の他の例を示す概略断面図である。

[図6]本発明の細胞培養用パターンニング基板における細胞接着補助部の形成方法の一例を示す工程図である。

[図7]本発明に用いられる光触媒含有層側基板の一例を示す概略断面図である。

[図8]本発明に用いられる光触媒含有層側基板の一例を示す概略断面図である。

[図9]本発明に用いられる光触媒含有層側基板の一例を示す概略断面図である。

[図10]本発明の細胞培養用パターンニング基板における細胞接着補助部の形成方法の他の例を示す工程図である。

[図11]本発明の細胞培養用パターンニング基板における細胞接着層の形成方法の一例を示す工程図である。

[図12]本発明の細胞培養用パターンニング基板の他の例を示す概略断面図である。

## 符号の説明

- [0020]
- 1 … 基材
  - 2 … 細胞培養領域
  - 3 … 細胞接着部
  - 4 … 細胞接着補助部
  - 5 … フォトマスク
  - 6 … エネルギー

## 発明を実施するための最良の形態

- [0021] 本発明は、細胞の培養に用いられる細胞培養用パターンニング基板に関するものであり、本発明の細胞培養用パターンニング基板は二つの実施態様がある。以下、それぞれの実施態様ごとに説明する。

- [0022] A. 第1実施態様

まず、本発明の細胞培養用パターンニング基板の第1実施態様について説明する。本発明の細胞培養用パターンニング基板の第1実施態様は、基材と、上記基材上に形成され、細胞を培養する領域であり、かつ細胞と接着性を有する細胞接着層を含有する細胞培養領域とを有する細胞培養用パターンニング基板であって、

上記細胞培養領域は、上記細胞接着層が形成された細胞接着部と、パターン状に形成され、かつ細胞と接着することを阻害する細胞接着補助部とを有し、上記細胞接着補助部は、上記細胞接着部に細胞を付着させた際、上記細胞接着補助部に隣接する2つの上記細胞接着部上の細胞どうしが、上記細胞接着補助部上で結合し得るように形成されているものである。

[0023] 本実施態様の細胞培養用パターンニング基板は、例えば図1に示すように、基材1と、その基材1上に形成された細胞培養領域2とを有するものであり、その細胞培養領域2は、細胞接着層が形成された細胞と接着性を有する細胞接着部3と、細胞と接着することを阻害する細胞接着補助部4とを有するものである。

[0024] ここで、一般的に細胞培養領域に細胞を付着させて細胞を培養し、組織を形成する場合、細胞は細胞培養領域の外側から内側にかけて徐々に配列する。また組織の形成の際には、個々の細胞が形態変化をして配列することが必要であり、この細胞の形態変化についても、細胞培養領域の端部から中央部にかけて徐々に行われるものである。

[0025] そのため、一般的な細胞培養用パターンニング基板を用いて細胞を培養した場合、細胞を培養する細胞培養領域の面積が大きいものである場合には、中央部での細胞の配列性が悪く、組織が形成されない場合や、細胞培養領域の中央部に細胞が接着しない場合等がある。また、中央部における細胞の形態変化性が悪く、目的とする組織が形成されない、という問題もあった。

[0026] 一方、本発明によれば、上記細胞培養領域中に細胞接着補助部が形成されており、例えば図1に示すように、細胞接着補助部4に挟まれた細胞接着部3で細胞が培養されることとなる。すなわち、細胞接着補助部4と細胞接着部3との境界から細胞の配列や、細胞の形態変化を生じさせることができ、細胞接着補助部4が形成されていない場合と比較して、細胞培養領域2の内側にも境界領域を設けることができる。そのため、細胞培養領域2に接着した細胞は、細胞培養領域2の内側に存在する細胞接着部3と、細胞接着補助部4との境界で刺激を受けることができる。これにより、細胞培養領域2の全域で、細胞の配列性や形態変化性を良好なものとするのが可能となるのである。



[0027] また、本実施態様においては、上記細胞接着補助部は、隣接する2つの細胞接着層上に付着した細胞どうしが、細胞接着補助部上で結合し得るように形成されており、例えば図1に示すように、aの領域の細胞接着部3に付着した細胞と、bの領域の細胞接着部3に付着した細胞とが、細胞接着補助部4上結合し得るように、細胞接着補助部4が形成されている。これにより、最終的には細胞培養領域2全面で培養された場合と同様の面積に細胞を培養することができるのである。これは、細胞との接着することを阻害する領域であっても、その両側に細胞が存在し、それらの細胞が影響を及ぼしあう程度近接している場合には、細胞と接着することを阻害する領域上でも、細胞どうしが相互作用することが可能となることによるものである。

[0028] また、細胞接着層に欠陥等がある場合には、細胞が活性化されてその領域に細胞が付着しやすいことが知られている。本実施態様においては、細胞培養領域内に形成されている細胞接着補助部がこのような欠陥と同様の効果を発揮して、細胞が活性化されるため、短時間で効率的に細胞を基板上に接着することができるのである。

[0029] 以下、本実施態様の細胞培養用パターンニング基板の各構成について説明する。

[0030] 1. 細胞培養領域

まず、本実施態様の細胞培養用パターンニング基板における細胞培養領域について説明する。本実施態様における細胞培養領域は、細胞を培養するために形成される領域であって、細胞と接着性を有する細胞接着層が形成された細胞接着部と、パターン状に形成され、かつ細胞と接着することを阻害する細胞接着補助部とを有する領域である。

[0031] 本実施態様においては、上記細胞培養領域は、例えば図1に示すように、基材1の一部に形成されていてもよく、また基材の全面が細胞培養領域とされていてもよい。ここで、例えば図1に示すように細胞培養領域2が、基材1の一部に形成される場合には、基材1上の細胞培養領域以外の領域は、細胞と接着することを阻害する細胞非培養領域とされている。また、本実施態様においては、1つの基材上に形成される細胞培養領域の数は、1つに限定されるものではなく、例えば図2に示すように、基材1上に細胞培養領域2が複数形成されていてもよい。この場合においても、基材1上の各細胞培養領域以外の領域は、上記細胞非培養領域とされる。

- [0032] また、目的とする組織の大きさや種類等によっても異なるものであるが、通常、一つの細胞培養領域の大きさは、 $0.05\text{mm}^2 \sim 8000\text{mm}^2$ 、中でも $0.1\text{mm}^2 \sim 10\text{mm}^2$ の範囲内とされる。
- [0033] ここで、上述したような細胞培養領域においては、上記細胞接着部中に細胞接着補助部がパターン状に形成されることとなる。本実施態様においてこの細胞接着補助部は、細胞接着補助部に隣接する2つの細胞接着部に付着した細胞どうしが細胞接着補助部上で結合し得るように形成されており、また細胞接着層上に付着した細胞が規則的に配列し、かつ細胞の形態変化が均一に生じるように形成されているものであれば、特に限定されるものではない。例えば図1に示すように、細胞培養領域2中に細胞接着補助部4がライン状に形成されていてもよく、また例えば図3に示すように、細胞培養領域2中に細胞接着補助部4がランダムに形成されていてもよい。
- [0034] 上記細胞接着補助部の幅は、培養する細胞の種類や大きさ等によっても異なるものであるが、通常 $0.5\mu\text{m} \sim 10\mu\text{m}$ 、中でも $1\mu\text{m} \sim 5\mu\text{m}$ の範囲内とされることが好ましい。上記範囲より幅が広い場合には、細胞接着補助部に隣接する2つの細胞接着部上に付着した細胞どうしが細胞接着補助部上で相互作用することが困難となるからであり、また上記範囲より幅が狭い場合には、後述のパターニング技術ではこのような大きさのパターンを精細に得ることが難しく、細胞接着補助部が、上述したような配列性や形態変化性に影響を及ぼすことが困難となるからである。
- [0035] またこの際、細胞接着補助部に挟まれる細胞接着部の幅（例えば図1においてxで表される距離）、もしくは細胞接着補助部と細胞非培養領域とに挟まれる細胞接着部の幅（例えば図1においてyで表される距離）は、培養する細胞の大きさや種類、目的とする組織の種類等によって適宜選択されるものであるが、通常 $1\mu\text{m} \sim 200\mu\text{m}$ 、中でも $40\mu\text{m} \sim 80\mu\text{m}$ の範囲内とされることが好ましい。これにより、細胞接着部に接着した細胞が規則的に配列することができ、かつ良好に形態変化が生じて組織を形成することが可能となるからである。
- [0036] 本実施態様においては、特に細胞接着補助部がライン状に形成されていることが好ましい。これにより、細胞培養領域を形成する際の設計が容易となり、また培養される細胞の配列性を良好なものとすることができるからである。ライン状とは、細胞接着

補助部が直線状に形成されていることをいい、例えば図1に示すように、細胞接着補助部4が連続的に形成されている場合だけでなく、例えば細胞接着補助部が破線状に形成されている場合等も含むものとする。また本実施態様においては、一方方向に細胞接着補助部がライン状に形成された場合だけでなく、例えば図4に示すように、複数の方向に細胞接着補助部4がライン状に形成されている場合も含むものとする。

[0037] またさらに、本実施態様においては、上記細胞接着部と細胞接着補助部との境界が凹凸を有するパターン状に形成されていてもよい。このような凹凸を有するパターンに沿って細胞を配列させることによって、細胞をより規則的に配列させることが可能となるからである。またこの場合、付着した細胞がより活性化されて、効率よく細胞の培養を行うことができる、という利点も有する。ここで、凹凸を有するパターン状とは、細胞が規則的に配列することが可能なようなパターンであれば、特に限定されるものではなく、例えば図5に示すように、細胞接着部3と細胞接着補助部4との境界が直角形状の凹凸を有するものであってもよく、また波形状等の凹凸を有するものであってもよい。また、例えば細胞接着補助部が破線状に形成されている場合や、細胞接着補助部がランダムなパターン状に形成されている場合であっても、この細胞接着補助部と細胞接着部との境界は凹凸を有するパターン状に形成されているものとしてすることができる。このような場合であっても、同様の効果を得ることが可能となるからである。

[0038] ここで、上記凹凸の凹部端から凸部端までの距離は、細胞接着層上に細胞を付着させた際、細胞が直線的に整列する大きさであることが好ましい。このような大きさとして具体的には、培養する細胞の形状等によって適宜選択されるものであるが、通常凹凸の凹部端から凸部端までの距離の平均が $0.5\mu\text{m}$ ～ $30\mu\text{m}$ 、中でも $1\mu\text{m}$ ～ $5\mu\text{m}$ の範囲内であることが好ましい。これにより、細胞を培養した際、細胞培養領域の端部において細胞が欠けることなく、目的とする形状に細胞を培養し、組織を形成することが可能となるからである。ここで、上記凹凸を有するパターンの凹部端から凸部端までの距離の平均の測定は、細胞接着部と細胞接着補助部の境界 $200\mu\text{m}$ の範囲における各凹凸の最底部から最頂部までの距離を測定し、その平均を算出した値とする。

以下、このような細胞培養領域を構成する細胞接着部および細胞接着補助部につ

いて、それぞれ説明する。

[0039] (細胞接着部)

まず、本実施態様に用いられる細胞接着部について説明する。本実施態様における細胞接着部は、細胞培養領域内において、基材上に、細胞と接着性を有する細胞接着層が形成された領域である。上記細胞接着層は、細胞と接着性を有するものであれば、特に限定されるものではなく、一般的な細胞培養用パターンニング基板に用いられる、細胞と接着性を有する層を用いることができる。本実施態様においては、このような細胞接着層をパターン状に形成することによって、細胞接着部とすることができ、例えば細胞と接着性を有する材料を含有する細胞接着層形成用塗工液をパターン状に塗布等することによって、細胞接着部を形成することができる。また、上記細胞接着層形成用塗工液を細胞培養領域全面に形成し、フォトリソグラフィ法等によって細胞接着部を形成することもできる。

[0040] また、本実施態様においては、上記細胞接着層が、細胞と接着性を有し、かつエネルギー照射に伴う光触媒の作用により分解または変性される細胞接着材料を含有する層であり、この細胞接着層にエネルギーを照射することにより、パターンニングが行われて細胞接着部が形成されるものとすることができる。この場合、例えば細胞接着層を細胞培養領域の全面に形成した後、細胞接着補助部を形成するパターン状にエネルギーを照射することによって、光触媒の作用により細胞接着材料を分解または変性させることができ、細胞と接着することを阻害する細胞接着補助部と、細胞との接着性を有する細胞接着部とを形成することができる。なお、このような細胞接着材料を含有する細胞接着層や、その際の細胞接着補助部の形成方法等については、後で詳しく説明する。

[0041] また、本実施態様に用いられる細胞接着層は、細胞との接着阻害性を有し、かつエネルギー照射に伴う光触媒の作用により分解される細胞接着阻害材料を含有する細胞接着阻害層を細胞培養領域全面に塗布し、その後、細胞接着補助部以外の領域に対してエネルギーを照射することにより、上記細胞接着阻害材料が分解または変性されて細胞との接着性を有するように形成されたものであってもよい。この場合、エネルギー照射されて細胞接着部とされた領域以外は、細胞と接着することを阻害

する領域であるため、細胞接着補助部として用いることが可能となる。このような細胞接着阻害材料を含有する細胞接着阻害層や、その際の細胞接着層の形成方法等についても、後で詳しく説明する。

[0042] (細胞接着補助部)

次に、本実施態様における細胞培養領域の細胞接着補助部について説明する。本実施態様における細胞接着補助部は、上記細胞培養領域中にパターン状に形成され、かつ細胞と接着することを阻害するものであって、上記細胞接着部に細胞を付着させた際、細胞接着補助部に隣接する2つの細胞接着部上の細胞どうしが、細胞接着補助部上で結合し得るように形成されているものであれば、特に限定されるものではない。

[0043] 本実施態様における細胞接着補助部は、例えば後述する基材が露出した領域等であってもよく、また一般的に用いられる、細胞と接着することを阻害する細胞接着阻害層等が形成されていてもよい。細胞接着阻害層の形成方法としては、一般的な印刷法やフォトリソグラフィ法、またはエネルギー照射に伴う光触媒の作用を利用したパターニングの方法等が挙げられる。エネルギー照射に伴う光触媒の作用を利用したパターニングの方法については、後述する細胞接着阻害材料を有する細胞接着阻害層を用いた細胞接着層の説明の項で、併せて説明するので、ここでの説明は省略する。

[0044] また、上述したように、細胞接着層が、エネルギー照射に伴う光触媒の作用により分解または変性される細胞接着材料を含有する層である場合には、細胞接着補助部は、この細胞接着材料の分解物または変性物等が残存した領域等であってもよい。この場合における細胞接着補助部の形成方法は、エネルギー照射に伴う光触媒の作用により分解等される細胞接着材料を含有する細胞接着層の説明の項で、併せて説明するので、ここでの説明は省略する。

[0045] 2. 基材

次に、本実施態様に用いられる基材について説明する。本実施態様に用いられる基材としては、上記細胞培養領域を形成可能なものであれば、特に限定されるものではなく、例えば金属、ガラス、シリコン等の無機材料、およびプラスチックで代表さ

れる有機材料等を用いることができる。また、基材の可撓性や透明性等は細胞培養用パターンニング基板の種類や用途等によって適宜選択される。

[0046] ここで、本実施態様においては、基材上の細胞培養領域以外の領域は、細胞を培養しない細胞非培養領域とされるので、細胞と接着することを阻害するものであることが好ましく、例えば、上記細胞培養領域以外の細胞非培養領域には、細胞と接着することを阻害する層等が形成されていてもよい。

[0047] 3. 細胞培養用パターンニング基板

次に、本実施態様の細胞培養用パターンニング基板について説明する。本実施態様の細胞培養用パターンニング基板は、上述した基材上に細胞培養領域が形成されているものであれば、特に限定されるものではなく、必要に応じて、例えば遮光部等の部材が形成されているものであってもよい。

[0048] 4. その他

上述したように、本実施態様の細胞培養用パターンニング基板の細胞培養領域に用いられる細胞接着層は、(1)エネルギー照射に伴う光触媒の作用により分解または変性される細胞接着材料を含有するものであってもよく、また、(2)細胞と接着することを阻害する細胞接着阻害性を有し、かつエネルギー照射に伴う光触媒の作用により分解または変性される細胞接着阻害材料を含有する細胞接着阻害層を形成した後、エネルギー照射することにより、細胞接着阻害材料を分解または変性させることにより形成されたものであってもよい。

以下、それぞれについてわけて説明する。

[0049] I. (1)の場合

まず、細胞接着層が、エネルギー照射に伴う光触媒の作用により分解または変性される細胞接着材料を含有するものである場合について説明する。このような細胞接着材料を含有する細胞接着層としては、以下の3つの態様が挙げられる。

[0050] 第1の態様としては、細胞接着層が、光触媒および細胞接着材料を含有する光触媒含有細胞接着層であり、この光触媒含有細胞接着層にエネルギー照射された場合、光触媒含有細胞接着層自体に含有される光触媒の作用によって、細胞接着材料が分解または変性される場合である。

[0051] 第2の態様としては、少なくとも細胞接着材料を含有する細胞接着層が、光触媒を少なくとも含有する光触媒処理層上に形成されており、細胞接着層にエネルギーが照射された場合、細胞接着層中の細胞接着材料が、隣接する光触媒処理層中の光触媒の作用により分解または変性される場合である。

[0052] 第3の態様としては、少なくとも細胞接着材料を含有する細胞接着層が基材上に形成されており、エネルギー照射の際、少なくとも光触媒を含有する光触媒含有層等を細胞接着層と対向させて、エネルギーを照射することによって、細胞接着材料が対向する光触媒含有層中の光触媒の作用により分解または変性される場合である。

以下、それぞれの態様ごとに説明する。

[0053] (1)第1の態様

まず、細胞接着層が、光触媒および細胞接着材料を含有する光触媒含有細胞接着層であり、その光触媒含有細胞接着層にエネルギー照射された場合、光触媒含有細胞接着層自体に含有される光触媒の作用によって、細胞接着材料が分解または変性される場合について説明する。

[0054] 本態様によれば、光触媒含有細胞接着層が光触媒と、上記細胞接着材料とを含有することから、光触媒含有細胞接着層にエネルギーを照射することによって、細胞接着材料を光触媒の作用により、分解または変性させることができ、エネルギーが照射された領域を、細胞が接着しない細胞接着補助部とすることができる。また、エネルギーが照射されていない領域は、細胞接着材料が残存することから、細胞との接着性が良好な細胞接着部とすることができる。したがって、特別な装置や複雑な工程を必要とせず、パターン状にエネルギーを照射することにより、細胞接着部の中に、細胞と接着することを阻害する細胞接着補助部を容易に形成することが可能となる。

[0055] このような光触媒含有細胞接着層の形成は、エネルギー照射に伴う光触媒の作用により分解または変性される細胞接着材料および光触媒を含有する光触媒含有細胞接着層形成用塗工液を塗布すること等により、行うことができる。この光触媒含有細胞接着層形成用塗工液の塗布は、一般的な塗布方法を用いて行うことができ、例えばスピコート法、スプレーコート法、ディップコート法、ロールコート法、ビードコート法等を用いることができる。

[0056] この際、上記光触媒含有細胞接着層の膜厚としては、細胞培養用パターンニング基板の種類等によって適宜選択されるものであるが、通常 $0.01\mu\text{m}$ ～ $1.0\mu\text{m}$ 程度、中でも $0.1\mu\text{m}$ ～ $0.3\mu\text{m}$ 程度とすることができる。

[0057] 以下、本態様に用いられる光触媒含有細胞接着層に含有される、細胞接着材料、および光触媒について説明し、さらに細胞接着補助部の形成方法について説明する。

[0058] a. 細胞接着材料

まず、本態様の光触媒含有細胞接着層に含有される細胞接着材料について説明する。本態様の光触媒含有細胞接着層に含有される細胞接着材料は、細胞と接着性を有しかつエネルギー照射に伴う光触媒の作用により分解または変性されるものであれば、その種類等は特に限定されるものではない。ここで、細胞と接着性を有するとは、細胞と良好に接着することをいい、細胞との接着性が細胞の種類によって異なる場合等には、目的とする細胞と良好に接着することをいう。

[0059] 本態様に用いられる細胞接着材料は、このような細胞との接着性を有しており、エネルギー照射に伴う光触媒の作用によって分解または変性されて、細胞との接着性を有しなくなるものや、細胞との接着を阻害する細胞接着阻害性を有するものに変化するもの等が用いられる。

[0060] ここで、上記のような細胞と接着性を有する材料には、物理化学的特性により細胞と接着性を有する材料と、生物化学的特性により細胞と接着性を有する材料との2種類がある。

[0061] 物理化学的特性により細胞と接着性を有する材料の、細胞との接着性を決定する物理化学的な因子としては、表面自由エネルギーや、静電相互作用等が挙げられる。例えば細胞との接着性が材料の表面自由エネルギーにより決定される場合には、材料が所定の範囲内の表面自由エネルギーを有すると細胞と材料との接着性が良好となり、その範囲を外れると細胞と材料との接着性が低下することとなる。このような表面自由エネルギーによる細胞の接着性の変化としては、例えば資料CMC出版バイオマテリアルの最先端 筏 義人(監修)p. 109下部に示されるような実験結果が知られている。このような因子により細胞との接着性を有する材料としては、例えば



親水化ポリスチレン、ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)等が挙げられる。このような材料を用いた場合、エネルギー照射に伴う光触媒の作用により、例えば上記材料の表面の官能基が置換等されたり、分解されること等によって、表面自由エネルギーが変化し、細胞との接着性を有しないもの、または細胞接着阻害性を有するものとすることができる。

[0062] また、静電相互作用等により細胞と材料との接着性が決定される場合、例えば材料が有する正電荷の量等によって細胞との接着性が決定されることとなる。このような静電相互作用により細胞との接着性を有する材料としては、例えばポリリジン等の塩基性高分子、アミノプロピルトリエトキシシラン、N-(2-アミノエチル)-3-アミノプロピルトリエトキシシラン等の塩基性化合物およびそれらを含む縮合物等が挙げられる。このような材料を用いた場合、エネルギー照射に伴う光触媒の作用により、上記材料が分解または変性されることによって、例えば表面に存在する正電荷量を変化させることができ、細胞との接着性を有しないもの、または細胞接着阻害性を有するものとすることができる。

[0063] また、生物学的特性により細胞と接着性を有する材料としては、特定の細胞と接着性が良好なもの、または多くの細胞と接着性が良好なもの等が挙げられ、具体的には、フィブロネクチン、ラミニン、テネイシン、ビトロネクチン、RGD(アルギニン-グリシン-アスパラギン酸)配列含有ペプチド、YIGSR(チロシン-イソロイシン-グリシン-セリン-アルギニン)配列含有ペプチド、コラーゲン、アテロコラーゲン、ゼラチン等が挙げられる。このような材料を用いた場合、エネルギー照射に伴う光触媒の作用により、例えば上記材料の構造の一部を破壊したり、主鎖を破壊すること等によって、細胞との接着性を有しないもの、または細胞接着阻害性を有するものとすることができる。

[0064] このような細胞接着材料は、上記材料の種類等によって異なるものであるが、光触媒含有細胞接着層中に通常0.01重量%〜95重量%、中でも1重量%〜10重量%含有されることが好ましい。これにより、細胞接着材料を含有する領域を細胞との接着性が良好な領域とすることができるからである。

[0065] b. 光触媒

次に、本態様の光触媒含有細胞接着層に含有される光触媒について説明する。

本態様に用いられる光触媒は、上述した細胞接着材料を、エネルギー照射に伴う光触媒の作用によって分解または変性させることが可能なものであれば、特に限定されるものではない。

[0066] ここで、後述するような酸化チタンに代表される光触媒の作用機構は、必ずしも明確なものではないが、光の照射によって生成したキャリアが、近傍の化合物との直接反応、あるいは、酸素、水の存在下で生じた活性酸素種によって、有機物の化学構造に変化を及ぼすものと考えられている。本態様においては、このキャリアが上述した細胞接着材料に作用を及ぼすものであると思われる。

[0067] 本態様に用いられる光触媒として、具体的には、光半導体として知られる例えば二酸化チタン( $\text{TiO}_2$ )、酸化亜鉛( $\text{ZnO}$ )、酸化スズ( $\text{SnO}_2$ )、チタン酸ストロンチウム( $\text{SrTiO}_3$ )、酸化タングステン( $\text{WO}_3$ )、酸化ビスマス( $\text{Bi}_2\text{O}_3$ )、および酸化鉄( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ )を挙げることができ、これらから選択して1種または2種以上を混合して用いることができる。

[0068] 本態様においては、特に二酸化チタンが、バンドギャップエネルギーが高く、化学的に安定で毒性もなく、入手も容易であることから好適に使用される。二酸化チタンには、アナターゼ型とルチル型があり本態様ではいずれも使用することができるが、アナターゼ型の二酸化チタンが好ましい。アナターゼ型二酸化チタンは励起波長が380nm以下にある。

[0069] このようなアナターゼ型二酸化チタンとしては、例えば、塩酸解膠型のアナターゼ型チタニアゾル(石原産業(株)製STS-02(平均粒径7nm)、石原産業(株)製ST-K01)、硝酸解膠型のアナターゼ型チタニアゾル(日産化学(株)製TA-15(平均粒径12nm))等を挙げることができる。

[0070] 光触媒の粒径は小さいほど光触媒反応が効果的に起こるので好ましく、平均粒径が50nm以下が好ましく、20nm以下の光触媒を使用するのが特に好ましい。

[0071] 本態様の光触媒含有細胞接着層における光触媒の含有量は、5〜95重量%、好ましくは10〜60重量%、さらに好ましくは20〜40重量%の範囲で設定することができる。

これにより、光触媒含有細胞接着層のエネルギー照射された領域の細胞接着材料を

分解または変性することが可能となるからである。

[0072] ここで、本態様に用いられる光触媒は、例えば高い親水性を有すること等によって、細胞との接着性が低いものであることが好ましい。これにより、上述した細胞接着材料が分解等されて光触媒が露出した領域を、細胞との接着性が低い領域として用いることが可能となるからである。

[0073] c. その他

本態様においては、光触媒含有細胞接着層中に、上記細胞接着材料や光触媒だけでなく、必要に応じて例えば、強度や耐性等を向上させるバインダ等を含有するものであってもよい。本態様においては、特にバインダとして、少なくともエネルギー照射された後に、細胞と接着することを阻害する細胞接着阻害性を有する材料が用いられることが好ましい。これにより、エネルギー照射された領域である細胞接着補助部の細胞との接着性を低いものとすることができるからである。このような材料としては、例えばエネルギー照射される前から上記細胞接着阻害性を有するものであってもよく、エネルギー照射に伴う光触媒の作用によって、細胞接着阻害性を有するものとなるものであってもよい。

[0074] 本態様においては、特にエネルギー照射に伴う光触媒の作用によって、細胞接着阻害性を有するものとなる材料をバインダとして用いることが好ましい。これにより、エネルギー照射される前の領域においては、上記細胞接着材料の細胞との接着性を阻害することがなく、エネルギー照射された領域のみを、細胞との接着性が低いものとすることができるからである。

[0075] このようなバインダとして用いられる材料としては、例えば主骨格が上記の光触媒の光励起により分解されないような高い結合エネルギーを有するものであって、光触媒の作用により分解されるような有機置換基を有するものが好ましく、例えば、(1)ゾルゲル反応等によりクロロまたはアルコキシシラン等を加水分解、重縮合して大きな強度を発揮するオルガノポリシロキサン、(2)撥水性や撥油性に優れた反応性シリコーンを架橋したオルガノポリシロキサン等を挙げることができる。

[0076] 上記の(1)の場合、一般式：

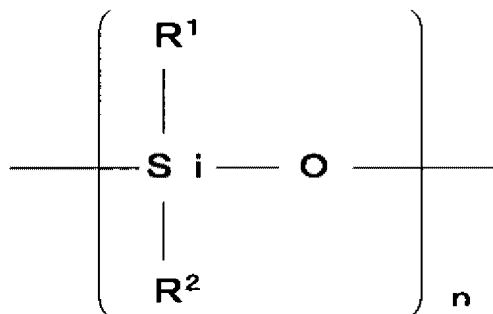


(ここで、Yはアルキル基、フルオロアルキル基、ビニル基、アミノ基、フェニル基もしくはエポキシ基、またはこれらを含む有機基であり、Xはアルコキシル基、アセチル基またはハロゲンを示す。nは0～3までの整数である。)

で示される珪素化合物の1種または2種以上の加水分解縮合物もしくは共加水分解縮合物であるオルガノポリシロキサンであることが好ましい。なお、ここでYで示される有機基の炭素数は1～20の範囲内であることが好ましく、また、Xで示されるアルコキシ基は、メトキシ基、エトキシ基、プロポキシ基、ブトキシ基であることが好ましい。

[0077] また、上記の(2)の反応性シリコーンとしては、下記一般式で表される骨格をもつ化合物を挙げることができる。

[0078] [化1]



[0079] ただし、nは2以上の整数であり、 $\text{R}^1$ 、 $\text{R}^2$ はそれぞれ炭素数1～20の置換もしくは非置換のアルキル、アルケニル、アリールあるいはシアノアルキル基であり、モル比で全体の40%以下がビニル、フェニル、ハロゲン化フェニルである。また、 $\text{R}^1$ 、 $\text{R}^2$ がメチル基のものが表面エネルギーが最も小さくなるので好ましく、モル比でメチル基が60%以上であることが好ましい。また、鎖末端もしくは側鎖には、分子鎖中に少なくとも1個以上の水酸基等の反応性基を有する。上記のような材料を用いることによって、エネルギー照射に伴う光触媒の作用により、エネルギー照射された領域の表面を高い親水性を有するものとすることができる。これにより、細胞との接着が阻害され、エネルギー照射された領域には細胞が接着しないものとすることができるからである。

[0080] 上記材料を細胞接着阻害性を有する材料として用いる場合、エネルギーが照射される前の水との接触角が $15^\circ$ ～ $120^\circ$ 、中でも $20^\circ$ ～ $100^\circ$ の範囲内となるものであることが好ましい。これにより、細胞との接着性を良好なものとすることができるから

である。

[0081] また、この細胞接着阻害性を有する材料にエネルギーが照射された場合には、水との接触角が $10^{\circ}$  以下となるものであることが好ましい。上記範囲とすることにより、高い親水性を有するものとすることができ、細胞との接着性を低いものとすることができるからである。

[0082] なお、ここでいう水との接触角は、水、もしくは同等の接触角を有する液体との接触角を接触角測定器(協和界面科学(株)製CA-Z型)を用いて測定(マイクロシリンジから液滴を滴下して30秒後)し、その結果から、もしくはその結果をグラフにして得たものである。

[0083] また、上記のオルガノポリシロキサンとともに、ジメチルポリシロキサンのような架橋反応をしない安定なオルガノシリコン化合物をバインダに混合してもよい。

また、本態様においては、エネルギーが照射された領域の濡れ性の変化を起こさせること等により、細胞との接着性が低下する、もしくはそのような変化を補助する分解物質等を含有するものであってもよい。

[0084] このような分解物質としては、例えばエネルギー照射に伴う光触媒の作用により分解等されて、親水性となること等により、細胞との接着性が低下する界面活性剤等を挙げることができる。具体的には、日光ケミカルズ(株)製NIKKOL BL、BC、BO、BBの各シリーズ等の炭化水素系、デュポン社製ZONYL FSN、FSO、旭硝子(株)製サーフロンS-141、145、大日本インキ化学工業(株)製メガファックF-141、144、ネオス(株)製フタージェントF-200、F251、ダイキン工業(株)製ユニダインDS-401、402、スリーエム(株)製フロラードFC-170、176等のシリコーン系の非イオン界面活性剤を挙げることができ、また、カチオン系界面活性剤、アニオン系界面活性剤、両性界面活性剤を用いることもできる。

[0085] また、界面活性剤の他にも、ポリビニルアルコール、不飽和ポリエステル、アクリル樹脂、ポリエチレン、ジアリルフタレート、エチレンプロピレンジエンモノマー、エポキシ樹脂、フェノール樹脂、ポリウレタン、メラミン樹脂、ポリカーボネート、ポリ塩化ビニル、ポリアミド、ポリイミド、スチレンブタジエンゴム、クロロプレンゴム、ポリプロピレン、ポリブチレン、ポリスチレン、ポリ酢酸ビニル、ナイロン、ポリエステル、ポリブタジエン、

ポリベンズイミダゾール、ポリアクリルニトリル、エピクロルヒドリン、ポリサルファイド、ポリイソプレン等のオリゴマー、ポリマー等を挙げることができる。

[0086] 本態様においては、このようなバインダは、光触媒含有細胞接着層中に5重量%～95重量%、中でも40重量%～90重量%、特に60重量%～80重量%の範囲内含有されることが好ましい。

[0087] また、本態様においては、基材の細胞培養領域上に、必要に応じて遮光部が形成されていてもよい。これにより、上記光触媒含有細胞接着層の全面に、基材側からエネルギーを照射した場合に、遮光部が形成された領域上の光触媒は励起されず、遮光部が形成された領域以外の細胞接着層中に含有される細胞接着材料を分解または変性させることができるからである。

[0088] このような遮光部としては、細胞接着補助部の形成の際に照射されるエネルギーを遮断することが可能なものであれば、特に限定されるものではなく、例えばスパッタリング法、真空蒸着法等により厚み1000～2000 Å程度のクロム等の金属薄膜を形成し、この薄膜をパターニングすることにより形成されてもよい。このパターニングの方法としては、スパッタ等の通常のパターニング方法を用いることができる。

[0089] また、樹脂バインダ中にカーボン微粒子、金属酸化物、無機顔料、有機顔料等の遮光性粒子を含有させた層をパターン状に形成する方法であってもよい。用いられる樹脂バインダとしては、ポリイミド樹脂、アクリル樹脂、エポキシ樹脂、ポリアクリルアミド、ポリビニルアルコール、ゼラチン、カゼイン、セルロース等の樹脂を1種または2種以上混合したものや、感光性樹脂、さらにはO/Wエマルジョン型の樹脂組成物、例えば、反応性シリコーンをエマルジョン化したもの等を用いることができる。このような樹脂製遮光部の厚みとしては、0.5～10 μmの範囲内で設定することができる。このような樹脂製遮光部のパターニングの方法は、フォトリソ法、印刷法等一般的に用いられている方法を用いることができる。

[0090] d. 細胞接着補助部の形成方法

次に、本態様における細胞接着補助部の形成方法について説明する。本態様においては、例えば図6に示すように、上記細胞接着材料および光触媒を含有する光触媒含有細胞接着層7に、例えばフォトマスク5等を用いてエネルギー6を、細胞接

着補助部を形成するパターン状に照射することにより(図6(a))、細胞接着層7中に、細胞接着性材料が分解または変性されて、細胞と接着することを阻害する細胞接着補助部4を形成することができる(図6(b))。この際、細胞接着補助部には、光触媒、および細胞接着材料の分解物や変性物等が含有されることとなる。

- [0091] ここで、本態様でいうエネルギー照射(露光)とは、エネルギー照射に伴う光触媒の作用によって、細胞接着材料を分解または変性させることが可能ないかなるエネルギー線の照射をも含む概念であり、光の照射に限定されるものではない。
- [0092] 通常このようなエネルギー照射に用いる光の波長は、400nm以下の範囲、好ましくは380nm以下の範囲から設定される。これは、上述したように光触媒として用いられる好ましい光触媒が二酸化チタンであり、この二酸化チタンにより光触媒作用を活性化させるエネルギーとして、上述した波長の光が好ましいからである。
- [0093] このようなエネルギー照射に用いることができる光源としては、水銀ランプ、メタルハライドランプ、キセノンランプ、エキシマランプ、その他種々の光源を挙げることができる。
- [0094] 上述したような光源を用い、フォトマスクを介したパターン照射により行う方法の他、エキシマ、YAG等のレーザを用いてパターン状に描画照射する方法を用いることも可能である。また、上述したように、基材が細胞接着部と同じパターン状に遮光部を有する場合には、基材側からエネルギーを全面に照射することにより、行うことができる。この場合、フォトマスク等が必要なく、位置あわせ等の工程が必要ない、という利点を有する。
- [0095] また、エネルギー照射に際してのエネルギーの照射量は、光触媒の作用によって細胞接着材料が分解または変性されるのに必要な照射量とする。
- [0096] この際、光触媒が含有される層を加熱しながらエネルギー照射することにより、感度を上昇させることが可能となり、効率的に細胞接着材料を分解または変性させることができる点で好ましい。具体的には30℃～80℃の範囲内で加熱することが好ましい。
- [0097] 本態様におけるフォトマスクを介して行うエネルギー照射の方向は、上述した基材が透明である場合は、基材側および光触媒含有細胞接着層側のいずれの方向から

エネルギー照射を行っても良い。一方、基材が不透明な場合は、光触媒含有細胞接着層側からエネルギー照射を行う必要がある。

[0098] (2) 第2の態様

次に、少なくとも細胞接着材料を含有する細胞接着層が、光触媒を少なくとも含有する光触媒処理層上に形成されており、細胞接着層にエネルギーが照射された場合、細胞接着層中の細胞接着材料が、隣接する光触媒処理層中の光触媒の作用により分解または変性される場合について説明する。

[0099] 本態様においては、上記細胞接着層が、光触媒処理層上に形成されていることから、細胞接着補助部を形成するパターン状にエネルギーを照射することによって、細胞接着層中の細胞接着材料が、隣接する光触媒処理層中の光触媒の作用により分解または変性されて、その領域の細胞との接着性が低下することから、細胞接着補助部として用いることが可能となるのである。この際、細胞接着補助部には、例えば上記細胞接着材料がエネルギー照射に伴う光触媒の作用により分解されるものである場合には、細胞接着材料が少量含有されている、または細胞接着材料の分解物等が含有されている、もしくは細胞接着層が完全に分解除去されて光触媒処理層が露出すること等となる。また、上記細胞接着材料がエネルギー照射に伴う光触媒の作用により変性されるものである場合には、細胞接着補助部中にはその変性物等が含有されていることとなる。

[0100] 以下、本態様に用いられる細胞接着層、および光触媒処理層について説明する。なお、本態様における細胞接着補助部の形成方法については、上述した第1の態様と同様であるので、ここでの説明は省略する。

[0101] a. 細胞接着層

まず、本態様に用いられる細胞接着層について説明する。本態様に用いられる細胞接着層は、少なくとも細胞との接着性を有する細胞接着材料を有する層であり、一般的に細胞との接着性を有する層として用いられる層を用いることができる。

[0102] 具体的な細胞接着材料としては、第1の態様で説明した光触媒含有細胞接着層に用いられる細胞接着材料と同様のものを用いることができるので、ここでの詳しい説明は省略する。また、本態様の細胞接着層にも、第1の態様の光触媒含有細胞接着



層で説明した細胞接着阻害性を有する材料が含有されていることが好ましい。これにより、エネルギー照射された領域である細胞接着補助部の細胞との接着性を低いものとするのが可能となるからである。

[0103] また、このような細胞接着層の形成は、上記細胞接着材料を含有する細胞接着層形成用塗工液を、一般的な塗布方法により塗布すること等により行うことができ、第1の態様の光触媒含有細胞接着層の形成方法と同様とすることができるので、ここでの説明は省略する。

[0104] なお、このような細胞接着層の膜厚は、細胞培養用パターンニング基板の種類等によって適宜選択されるものであるが、通常 $0.001\mu\text{m}$ 〜 $1.0\mu\text{m}$ 程度、中でも $0.005\mu\text{m}$ 〜 $0.3\mu\text{m}$ 程度とすることができる。

[0105] b. 光触媒処理層

次に、本態様に用いられる光触媒処理層について説明する。本態様に用いられる光触媒処理層は、少なくとも光触媒を含有する層であれば、特に限定されるものではなく、光触媒のみからなる層であってもよく、またバインダ等、他の成分を含有する層等であってもよい。

[0106] 本態様で使用する光触媒としては、第1の態様における光触媒含有細胞接着層に用いられるものと同様とすることができ、本態様においても特に酸化チタンが用いられることが好ましい。

[0107] ここで、光触媒のみからなる光触媒処理層を用いた場合には、上記細胞接着層中の細胞接着材料の分解または変性に対する効率が向上し、処理時間の短縮化等のコスト面で有利である。一方、光触媒とバインダとからなる光触媒処理層を用いた場合には、光触媒処理層の形成が容易であるという利点を有する。

[0108] 光触媒のみからなる光触媒処理層の形成方法としては、例えば、スパッタリング法、CVD法、真空蒸着法等の真空製膜法を用いる方法を挙げることができる。真空製膜法により光触媒処理層を形成することにより、均一な膜でかつ光触媒のみを含有する光触媒処理層とすることが可能であり、これにより細胞接着材料を均一に分解または変性させることが可能であり、かつ光触媒のみからなることから、バインダを用いる場合と比較して効率的に細胞接着材料を分解または変性させることが可能となる。

- [0109] また、光触媒のみからなる光触媒処理層の形成方法の他の例としては、例えば光触媒が二酸化チタンの場合、基材上に無定形チタニアを形成し、次いで焼成により結晶性チタニアに相変化させる方法等が挙げられる。ここで用いられる無定形チタニアとしては、例えば四塩化チタン、硫酸チタン等のチタンの無機塩の加水分解、脱水縮合、テトラエトキシチタン、テトライソプロポキシチタン、テトラ $n$ -プロポキシチタン、テトラブトキシチタン、テトラメトキシチタン等の有機チタン化合物を酸存在下において加水分解、脱水縮合によって得ることができる。次いで、400℃～500℃における焼成によってアナターゼ型チタニアに変性し、600℃～700℃の焼成によってルチル型チタニアに変性することができる。
- [0110] また、バインダを用いる場合は、バインダの主骨格が上記の光触媒の光励起により分解されないような高い結合エネルギーを有するものが好ましく、例えばこのようなバインダとしては、上述した細胞接着層の項で説明したオルガノポリシロキサン等を挙げることができる。
- [0111] このようにオルガノポリシロキサンをバインダとして用いた場合は、上記光触媒処理層は、光触媒とバインダであるオルガノポリシロキサンを必要に応じて他の添加剤とともに溶剤中に分散して塗布液を調製し、この塗布液を基材上に塗布することにより形成することができる。使用する溶剤としては、エタノール、イソプロパノール等のアルコール系の有機溶剤が好ましい。塗布はスピコート、スプレーコート、ディップコート、ロールコート、ビードコート等の公知の塗布方法により行うことができる。バインダとして紫外線硬化型の成分を含有している場合、紫外線を照射して硬化処理を行うことにより光触媒処理層を形成することができる。
- [0112] また、バインダとして無定形シリカ前駆体を用いることができる。この無定形シリカ前駆体は、一般式 $\text{SiX}_4$ で表され、Xはハロゲン、メトキシ基、エトキシ基、またはアセチル基等であるケイ素化合物、それらの加水分解物であるシラノール、または平均分子量3000以下のポリシロキサンが好ましい。
- [0113] 具体的には、テトラエトキシシラン、テトライソプロポキシシラン、テトラ $n$ -プロポキシシラン、テトラブトキシシラン、テトラメトキシシラン等が挙げられる。また、この場合には、無定形シリカの前駆体と光触媒の粒子とを非水性溶媒中に均一に分散させ、透

明基材上に空気中の水分により加水分解させてシラノールを形成させた後、常温で脱水縮重合することにより光触媒処理層を形成できる。シラノールの脱水縮重合を100℃以上で行えば、シラノールの重合度が増し、膜表面の強度を向上できる。また、これらの結着剤は、単独あるいは2種以上を混合して用いることができる。

[0114] 光触媒処理層中の光触媒の含有量は、5〜60重量%、好ましくは20〜40重量%の範囲で設定することができる。また、光触媒処理層の厚みは、0.05〜10  $\mu$ mの範囲内が好ましい。

[0115] また、光触媒処理層には上記の光触媒、バインダの他に、上述した細胞接着層に用いられる界面活性剤等を含有させることもできる。

[0116] ここで、本態様においては上記光触媒処理層は、その表面は細胞との接着性が、例えば表面が親水性であること等によって細胞との接着性が低いことが好ましい。これにより、上記細胞接着層が分解等されて光触媒処理層が露出した場合に、その領域を細胞との接着性が低い領域とすることができるからである。

[0117] また、本態様においては、上述したように上記光触媒処理層上に遮光部が形成されていてもよい。これにより、上記細胞接着層の全面にエネルギーを照射した場合に、遮光部が形成された領域上の光触媒は励起されず、遮光部が形成された領域以外の細胞接着層中に含有される細胞接着材料を分解または変性させることができるからである。またこの場合、遮光部が形成されている領域の光触媒は励起されないことから、エネルギーが照射される方向が特に限定されない、という利点を有する。

[0118] このような遮光部としては、第1の態様で説明したものと同様のものを用いることが可能であるので、ここでの詳しい説明は省略する。

[0119] (3)第3の態様

次に、少なくとも細胞接着材料を含有する細胞接着層が基材上に形成されており、エネルギー照射の際、少なくとも光触媒を含有する光触媒含有層等を細胞接着層と対向させて、エネルギーを照射することによって、細胞接着材料が対向する光触媒含有層中の光触媒の作用により分解または変性される場合について説明する。

[0120] 本態様においては、細胞接着層と、上記光触媒含有層とを対向させて配置し、細胞接着補助部を形成するパターン状にエネルギーを照射することにより、光触媒含

有層中の光触媒の作用により、細胞接着層中の細胞接着材料が分解または変性されて、細胞接着補助部を形成することが可能となるのである。

[0121] 以下、本態様に用いられる光触媒含有層側基板と、その光触媒含有層側基板を用いて細胞接着補助部を形成する方法について説明する。なお、本態様に用いられる細胞接着層については、上述した第2の態様で用いられる細胞接着層と同様であるので、ここでの説明は省略する。

[0122] a. 光触媒含有層側基板

まず、本態様に用いられる光触媒を含有する光触媒含有層を有する光触媒含有層側基板について説明する。本態様に用いられる光触媒含有層側基板としては、通常、光触媒を含有する光触媒含有層を有するものであり、通常、基体と、その基体上に光触媒含有層が形成されているものである。この光触媒含有層側基板は、例えばパターン状に形成された光触媒含有層側遮光部やプライマー層等を有していてもよい。以下、本態様に用いられる光触媒含有層側基板の各構成について説明する。

[0123] (i) 光触媒含有層

まず、光触媒含有層側基板に用いられる光触媒含有層について説明する。本態様に用いられる光触媒含有層は、光触媒含有層中の光触媒が、近接する細胞接着層中の細胞接着材料を分解または変性させるような構成であれば、特に限定されるものではなく、光触媒とバインダとから構成されているものであってもよく、光触媒単体で製膜されたものであってもよい。また、その表面の特性は特に親液性であっても撥液性であってもよい。

[0124] 本態様において用いられる光触媒含有層は、基体上に全面に形成されたものであってもよいが、例えば図7に示すように、基体11上に光触媒含有層12がパターン上に形成されたものであってもよい。

[0125] このように光触媒含有層をパターン状に形成することにより、細胞接着補助部を形成するためにエネルギーを照射する際に、フォトマスク等を用いるパターン照射をする必要がなく、全面に照射することにより、細胞接着層に含有される細胞接着材料が分解または変性された細胞接着補助部を形成することができる。

[0126] この光触媒含有層のパターニング方法は、特に限定されるものではないが、例えば

フォトリソグラフィ法等により行うことが可能である。

また、実際に光触媒含有層に面する細胞接着層上の部分のみの、細胞接着材料が分解または変性されるものであるので、エネルギーの照射方向は上記光触媒含有層と細胞接着層とが面する部分にエネルギーが照射されるものであれば、いかなる方向から照射されてもよく、さらには、照射されるエネルギーも特に平行光等の平行なものに限定されないという利点を有するものとなる。

[0127] ここで、本態様で用いられる光触媒含有層については、上述した第2の態様で説明した光触媒処理層と同様のものを用いることが可能であるので、ここでの詳しい説明は省略する。

[0128] (ii) 基体

次に、光触媒含有層側基板に用いられる基体について説明する。通常、光触媒含有層側基板は、少なくとも基体とこの基体上に形成された光触媒含有層とを有するものである。この際、用いられる基体を構成する材料は、後述するエネルギーの照射方向や、得られるパターン形成体が透明性を必要とするか等により適宜選択される。

[0129] また本態様に用いられる基体は、可撓性を有するもの、例えば樹脂製フィルム等であつてもよいし、可撓性を有しないもの、例えばガラス基板等であつてもよい。これは、エネルギー照射方法により適宜選択されるものである。

[0130] なお、基体表面と光触媒含有層との密着性を向上させるために、基体上にアンカー層を形成するようにしてもよい。このようなアンカー層としては、例えば、シラン系、チタン系のカップリング剤等を挙げることができる。

[0131] (iii) 光触媒含有層側遮光部

本態様に用いられる光触媒含有層側基板には、パターン状に形成された光触媒含有層側遮光部が形成されたものを用いても良い。このように光触媒含有層側遮光部を有する光触媒含有層側基板を用いることにより、エネルギー照射に際して、フォトマスクを用いたり、レーザ光による描画照射を行う必要がない。したがって、光触媒含有層側基板とフォトマスクとの位置合わせが不要であることから、簡便な工程とすることが可能であり、また描画照射に必要な高価な装置も不必要であることから、コスト的に有利となるという利点を有する。

- [0132] このような光触媒含有層側遮光部を有する光触媒含有層側基板は、光触媒含有層側遮光部の形成位置により、下記の二つの態様とすることができる。
- [0133] 一つが、例えば図8に示すように、基体11上に光触媒含有層側遮光部14を形成し、この光触媒含有層側遮光部14上に光触媒含有層12を形成して、光触媒含有層側基板とする態様である。もう一つは、例えば図9に示すように、基体11上に光触媒含有層12を形成し、その上に光触媒含有層側遮光部14を形成して光触媒含有層側基板とする態様である。
- [0134] いずれの態様においても、フォトマスクを用いる場合と比較すると、光触媒含有層側遮光部が、上記光触媒含有層と細胞接着層との配置部分の近傍に配置されることになるので、基体内等におけるエネルギーの散乱の影響を少なくすることができることから、エネルギーのパターン照射を極めて正確に行うことが可能となる。
- [0135] ここで、本態様においては、図9に示すような光触媒含有層12上に光触媒含有層側遮光部14を形成する態様である場合には、光触媒含有層と細胞接着層とを所定の位置に配置する際に、この光触媒含有層側遮光部の膜厚をこの間隙の幅と一致させておくことにより、上記光触媒含有層側遮光部を上記間隙を一定のものとするためのスペーサとしても用いることができるという利点を有する。
- [0136] すなわち、所定の間隙において上記光触媒含有層と細胞接着層とを対向させた状態で配置する際に、上記光触媒含有層側遮光部と細胞接着層とを密着させた状態で配置することにより、上記所定の間隙を正確とすることが可能となり、そしてこの状態でエネルギーを照射することにより、細胞接着層と遮光部とが接触している部分の細胞接着層は、細胞接着材料が分解または変性されないことから、細胞接着補助部を精度良く形成することが可能となるのである。
- [0137] このような光触媒含有層側遮光部の形成方法は、特に限定されるものではなく、光触媒含有層側遮光部の形成面の特性や、必要とするエネルギーに対する遮蔽性等に応じて適宜選択されて用いられ、第1の態様で説明した基材上に設けられる遮光部と同様のものとするので、ここでの詳しい説明は省略する。
- [0138] なお、上記説明においては、光触媒含有層側遮光部の形成位置として、基体と光触媒含有層との間、および光触媒含有層表面の二つの場合について説明したが、

その他、基体の光触媒含有層が形成されていない側の表面に光触媒含有層側遮光部を形成する態様も採ることが可能である。この態様においては、例えばフォトマスクをこの表面に着脱可能な程度に密着させる場合等が考えられ、細胞接着補助部のパターンを小ロットで変更するような場合に好適に用いることができる。

[0139] (iv) プライマー層

次に、本態様の光触媒含有層側基板に用いられるプライマー層について説明する。本態様において、上述したように基体上に光触媒含有層側遮光部をパターン状に形成して、その上に光触媒含有層を形成して光触媒含有層側基板とする場合においては、上記光触媒含有層側遮光部と光触媒含有層との間にプライマー層を形成してもよい。

[0140] このプライマー層の作用・機能は必ずしも明確なものではないが、光触媒含有層側遮光部と光触媒含有層との間にプライマー層を形成することにより、プライマー層は光触媒の作用による細胞接着材料の分解または変性を阻害する要因となる光触媒含有層側遮光部および光触媒含有層側遮光部間に存在する開口部からの不純物、特に、光触媒含有層側遮光部をパターニングする際に生じる残渣や、金属、金属イオン等の不純物の拡散を防止する機能を示すものと考えられる。したがって、プライマー層を形成することにより、高感度で細胞接着材料の分解または変性の処理が進行し、その結果、高精細に形成された細胞接着補助部を得ることが可能となるのである。

[0141] なお、本態様においてプライマー層は、光触媒含有層側遮光部のみならず光触媒含有層側遮光部間に形成された開口部に存在する不純物が光触媒の作用に影響することを防止するものであるので、プライマー層は開口部を含めた光触媒含有層側遮光部全面にわたって形成されていることが好ましい。

[0142] 本態様におけるプライマー層は、光触媒含有層側基板の光触媒含有層側遮光部と光触媒含有層とが接触しないようにプライマー層が形成された構造であれば特に限定されるものではない。

[0143] このプライマー層を構成する材料としては、特に限定されるものではないが、光触媒の作用により分解されにくい無機材料が好ましい。具体的には無定形シリカを挙げ

ることができる。このような無定形シリカを用いる場合には、この無定形シリカの前駆体は、一般式 $\text{SiX}_4$ で示され、Xはハロゲン、メキシ基、エトキシ基、またはアセチル基等であるケイ素化合物であり、それらの加水分解物であるシラノール、または平均分子量3000以下のポリシロキサンが好ましい。

また、プライマー層の膜厚は、 $0.001\text{ }\mu\text{m}$ から $1\text{ }\mu\text{m}$ の範囲内であることが好ましく、特に $0.001\text{ }\mu\text{m}$ から $0.1\text{ }\mu\text{m}$ の範囲内であることが好ましい。

[0144] b. 細胞接着補助部の形成方法

次に、本態様における細胞接着補助部の形成方法について説明する。本態様においては、例えば図10に示すように、細胞接着層7と、光触媒含有層側基板13の光触媒含有層12とを、所定の間隔をおいて配置し、例えばフォトマスク5等を用いて、エネルギー6を所定の方向から照射する。これにより、エネルギー照射された領域の細胞接着材料が分解または変性されて、細胞と接着することを阻害する細胞接着補助部4が細胞接着層7中に形成されるのである。この際、細胞接着補助部は、例えば上記細胞接着材料がエネルギー照射に伴う光触媒の作用により分解されるものである場合には、細胞接着補助部中にはその細胞接着材料が少量含有されている、または細胞接着材料の分解物等が含有されている、もしくは細胞接着層が完全に分解除去されて基材が露出すること等となる。また、上記細胞接着材料がエネルギー照射に伴う光触媒の作用により変性されるものである場合には、細胞接着補助部中にはその変性物等が含有されていることとなる。

[0145] 上記の配置とは、実質的に光触媒の作用が細胞接着層表面に及ぶような状態で配置された状態をいうこととし、実際に物理的に接触している状態の他、所定の間隔を隔てて上記光触媒含有層と細胞接着層とが配置された状態とする。この間隔は、 $200\text{ }\mu\text{m}$ 以下であることが好ましい。

[0146] 本態様において上記間隔は、パターン精度が極めて良好であり、光触媒の感度も高く、したがって細胞接着層中の細胞接着材料の分解または変性の効率が良好である点を考慮すると特に $0.2\text{ }\mu\text{m}$ 〜 $10\text{ }\mu\text{m}$ の範囲内、好ましくは $1\text{ }\mu\text{m}$ 〜 $5\text{ }\mu\text{m}$ の範囲内とすることが好ましい。このような間隔の範囲は、特に間隔を高い精度で制御することが可能である小面積の細胞接着層に対して特に有効である。



- [0147] 一方、例えば300mm×300mm以上といった大面積の細胞接着層に対して処理を行う場合は、接触することなく、かつ上述したような微細な間隙を光触媒含有層側基板と細胞接着層との間に形成することは極めて困難である。したがって、細胞接着層が比較的大面積である場合は、上記間隙は、10～100  $\mu\text{m}$ の範囲内、特に50～75  $\mu\text{m}$ の範囲内とすることが好ましい。間隙をこのような範囲内とすることにより、パターンがぼやける等のパターン精度の低下の問題や、光触媒の感度が悪化して細胞接着材料を分解または変性させる効率が悪化する等の問題が生じることなく、さらに細胞接着材料の分解または変性にムラが発生しないといった効果を有するからである。
- [0148] このように比較的大面積の細胞接着層をエネルギー照射する際には、エネルギー照射装置内の光触媒含有層側基板と細胞接着層との位置決め装置における間隙の設定を、10  $\mu\text{m}$ ～200  $\mu\text{m}$ の範囲内、特に25  $\mu\text{m}$ ～75  $\mu\text{m}$ の範囲内に設定することが好ましい。設定値をこのような範囲内とすることにより、パターン精度の大幅な低下や光触媒の感度の大幅な悪化を招くことなく、かつ光触媒含有層側基板と細胞接着層とが接触することなく配置することが可能となるからである。
- [0149] このように光触媒含有層と細胞接着層表面とを所定の間隔で離して配置することにより、酸素と水および光触媒作用により生じた活性酸素種が脱着しやすくなる。すなわち、上記範囲より光触媒含有層と細胞接着層との間隔を狭くした場合は、上記活性酸素種の脱着がしにくくなり、結果的に細胞接着材料を分解または変性させる速度を遅くしてしまう可能性があることから好ましくない。また、上記範囲より間隔を離して配置した場合は、生じた活性酸素種が細胞接着層に届き難くなり、この場合も細胞接着材料の分解または変性の速度を遅くしてしまう可能性があることから好ましくない。
- [0150] このような極めて狭い間隙を均一に形成して光触媒含有層と細胞接着層とを配置する方法としては、例えばスペーサを用いる方法を挙げることができる。そして、このようにスペーサを用いることにより、均一な間隙を形成することができると共に、このスペーサが接触する部分は、光触媒の作用が細胞接着層表面に及ばないことから、このスペーサを上述した細胞接着部と同様のパターンを有するものとすることにより、ス

ペーサの形成されていない部分のみの細胞接着材料を分解または変性させることができ、高精細に細胞接着補助部を形成することができるのである。また、このようなスぺーサを用いることにより、光触媒の作用により生じた活性酸素種が拡散することなく、高濃度で細胞接着層表面に到達することから、効率よく高精細な細胞接着補助部を形成することができる。

[0151] 本態様においては、このような光触媒含有層側基板の配置状態は、少なくともエネルギー照射の間だけ維持されればよい。

[0152] ここで、本態様でいうエネルギー照射(露光)とは、エネルギー照射に伴う光触媒の作用によって、細胞接着材料を分解または変性させることが可能ないかなるエネルギー線の照射をも含む概念であり、光の照射に限定されるものではない。

[0153] ここで、本態様において照射されるエネルギーの種類等については、上述した第1の態様で説明したものと同様であるので、ここでの詳しい説明は省略する。

[0154] なお、本態様におけるフォトマスクを介して行うエネルギー照射の方向は、上述した基材が透明である場合は、基材側および光触媒含有層側基板のいずれの方向からエネルギー照射を行っても良い。一方、基材が不透明な場合は、光触媒含有層側基板側からエネルギー照射を行う必要がある。

[0155] II. (2)の場合

次に、細胞接着層が、細胞と接着することを阻害する細胞接着阻害性を有し、かつエネルギー照射に伴う光触媒の作用により分解または変性される細胞接着阻害材料を含有する細胞接着阻害層を形成した後、エネルギー照射することにより、細胞接着阻害材料を分解または変性させて形成されたものである場合について説明する。この場合、以下の3つの態様が挙げられる。

[0156] 第1の態様としては、細胞接着阻害層が、細胞と接着することを阻害する細胞接着阻害材料および光触媒を含有する光触媒含有細胞接着阻害層であり、この光触媒含有細胞接着阻害層に細胞接着層を形成するパターン状にエネルギーを照射することにより、光触媒含有細胞接着阻害層自体に含有される光触媒の作用によって細胞接着阻害材料が分解または変性された細胞接着層とする場合である。

[0157] 第2の態様としては、少なくとも細胞接着阻害材料を含有する細胞接着阻害層が、

光触媒を少なくとも含有する光触媒処理層上に形成されており、この細胞接着阻害層に細胞接着層を形成するパターン状にエネルギーを照射することにより、光触媒処理層に含有される光触媒の作用により細胞接着阻害材料が分解または変性された細胞接着層とする場合である。

[0158] 第3の態様としては、少なくとも細胞接着阻害材料を含有する細胞接着阻害層が基材上に形成されており、この細胞接着阻害層と、少なくとも光触媒を含有する光触媒含有層等を細胞接着阻害層と対向させて、細胞接着層を形成するパターン状にエネルギーを照射することによって、細胞接着阻害材料が分解または変性された細胞接着層とする場合である。

以下、それぞれの態様ごとにわけて説明する。

[0159] (1)第1の態様

まず、細胞接着阻害層が、細胞と接着することを阻害する細胞接着阻害材料および光触媒を含有する光触媒含有細胞接着阻害層であり、この光触媒含有細胞接着層に細胞接着層を形成するパターン状にエネルギーを照射することにより、光触媒処理層に含有される光触媒の作用により細胞接着阻害材料が分解または変性されて細胞接着層が形成される場合について説明する。

[0160] 本態様によれば、光触媒含有細胞接着阻害層が、光触媒と、上記細胞接着阻害材料を含有することから、光触媒含有細胞接着阻害層にエネルギー照射することによって、細胞接着阻害材料を光触媒の作用により、分解または変性させることができ、エネルギーが照射された領域を細胞との接着性を有する細胞接着部、すなわち細胞接着層とすることができるのである。またこの際、エネルギーが照射されていない領域を細胞接着補助部とすることができる。

[0161] このような光触媒含有細胞接着阻害層の形成は、エネルギー照射に伴う光触媒の作用により分解または変性される細胞接着材料および光触媒を含有する光触媒含有細胞接着阻害層形成用塗工液を細胞培養領域に塗布すること等により行うことができる。この光触媒含有細胞接着阻害層形成用塗工液の塗布は、一般的な塗布方法を用いて行うことができ、例えばスピコート法、スプレーコート法、ディップコート法、ロールコート法、ビードコート法等を用いることができる。

[0162] この際、上記光触媒含有細胞接着阻害層の膜厚としては、細胞培養用パターンニング基板の種類等によって適宜選択されるものであるが、通常 $0.01\mu\text{m}$ 〜 $1.0\mu\text{m}$ 程度、中でも $0.1\mu\text{m}$ 〜 $0.3\mu\text{m}$ 程度とすることができる。

[0163] 以下、細胞接着阻害材料について説明し、さらに、細胞接着層の形成方法について説明する。なお、本態様に用いられる光触媒については、上述した「I. (1)の場合」の第1態様で用いられる光触媒と同様とすることができるので、ここでの詳しい説明は省略する。

a. 細胞接着阻害材料

まず、本態様に用いられる光触媒含有細胞接着阻害層に含有される細胞接着阻害材料について説明する。

[0164] 本態様に用いられる細胞接着阻害材料は、細胞と接着することを阻害する細胞接着阻害性を有し、かつエネルギー照射に伴う光触媒の作用により分解または変性されるものであれば、その種類等は特に限定されるものではない。

[0165] ここで、上記細胞接着阻害性を有するとは、細胞が細胞接着阻害材料と接着することを阻害する性質を有することをいい、細胞との接着性が細胞の種類によって異なる場合等には、目的とする細胞との接着を阻害する性質を有することをいう。

[0166] 本態様に用いられる細胞接着阻害材料は、このような細胞接着阻害性を有しており、エネルギー照射に伴う光触媒の作用によって分解または変性されて、細胞接着阻害性を有しなくなるものや、細胞との接着性が良好となるものが用いられる。

[0167] このような細胞接着阻害材料としては、例えば水和能の高い材料を用いることができる。水和能の高い材料は、周りに水分子が集まった水和層が形成され、通常、このような水和能の高い物質は水分子との接着性の方が細胞との接着性より高いことから、細胞は上記水和能の高い材料と接着することができず、細胞との接着性が低いものとなるのである。ここで、上記水和能とは、水分子と水和する性質をいい、水和能が高いとは、水分子と水和しやすいことをいうこととする。

[0168] 上記水和能が高く細胞接着阻害材料として用いられる材料としては、例えばポリエチレングリコールや、ベタイン構造等を有する両性イオン材料、リン脂質含有材料等が挙げられる。このような材料を上記細胞接着阻害材料として用いた場合、後述する

エネルギー照射工程においてエネルギーが照射された際、光触媒の作用によって、上記細胞接着阻害材料が分解または変質等され、表面の水和層が離れることにより、上記細胞接着阻害性を有しないものとすることができるのである。

[0169] また、本態様においては、上記細胞接着阻害材料として、光触媒の作用により分解されるような、撥水性または撥油性の有機置換基を有する界面活性剤も用いることができる。このような界面活性剤としては、例えば、日光ケミカルズ(株)製NIKKOL B L、BC、BO、BBの各シリーズ等の炭化水素系、デュポン社製ZONYL FSN、FSO、旭硝子(株)製サーフロンS-141、145、大日本インキ化学工業(株)製メガファックF-141、144、ネオス(株)製フタージェントF-200、F251、ダイキン工業(株)製ユニダインDS-401、402、スリーエム(株)製フロラードFC-170、176等のフッ素系あるいはシリコン系の非イオン界面活性剤を挙げることができ、また、カチオン系界面活性剤、アニオン系界面活性剤、両性界面活性剤を用いることもできる。

[0170] このような材料を細胞接着阻害材料として用いて光触媒含有細胞接着阻害層を形成した際に、表面に上記細胞接着阻害材料が偏在することとなる。これにより、表面の撥水性や撥油性を高いものとすることができ、細胞との相互作用が小さく、細胞との接着性が低いものとすることができるのである。また、この層にエネルギー照射工程において、エネルギーが照射された場合には、光触媒の作用によって、容易に分解されて上記光触媒が露出し、上記細胞接着阻害性を有しないものとすることができるのである。

[0171] 本態様においては、上記細胞接着阻害材料として、エネルギー照射に伴う光触媒の作用により細胞との接着性が良好となるものが用いられることが特に好ましく、このような細胞接着阻害材料としては、例えば撥油性や撥水性を有する材料が挙げられる。

[0172] 細胞接着阻害材料として、上記撥水性または撥油性を有する材料を用いた場合には、細胞接着阻害材料の撥水性または撥油性によって、細胞と細胞接着阻害材料との間における、例えば疎水性相互作用等の相互作用が小さく、細胞との接着性を低いものとすることができる。

[0173] このような撥水性または撥油性を有する材料としては、例えば骨格が光触媒の作用

により分解されないような高い結合エネルギーを有するものであって、光触媒の作用により分解されるような撥水性または撥油性の有機置換基を有するもの等を挙げることができる。

[0174] 骨格が光触媒の作用により分解されないような高い結合エネルギーを有するものであって、光触媒の作用により分解されるような撥水性または撥油性の有機置換基を有するものとしては、例えば、上述した「I. (1) の場合」にバインダとして用いられる(1)ゾルゲル反応等によりクロロまたはアルコキシシラン等を加水分解、重縮合して大きな強度を発揮するオルガノポリシロキサン、(2)反応性シリコーンを架橋したオルガノポリシロキサン等を挙げることができる。

[0175] このような物質は、「I. (1) の場合」においてバインダとして用いられる場合には、上記オルガノポリシロキサン等の側鎖等をエネルギー照射に伴う光触媒の作用により、高い割合で分解または変性させて、超親水性とすることにより、細胞接着阻害性を有する材料として用いられる。

[0176] 一方、本態様において、細胞接着阻害材料として用いられる場合には、上記オルガノポリシロキサン等の側鎖等は、エネルギー照射に伴う光触媒の作用により完全には分解または変性等されない程度、エネルギーを照射することによって、エネルギーが照射された領域を細胞との接着性を有するものとすることができる。

[0177] ここで、上記材料を細胞接着阻害材料として用いる場合、通常、水との接触角が $80^{\circ}$ 以上、中でも $100^{\circ}$ ～ $130^{\circ}$ の範囲内である材料を細胞接着阻害材料として用いることが好ましい。これにより、細胞との接着性を低いものとすることができるからである。なお、上記角度の上限は、平坦な基材上での細胞接着阻害材料の水との接触角の上限であり、例えば凹凸を有するような基材上での上記細胞接着阻害材料の水との接触角を測定した場合には、例えば資料ジャパニーズ・ジャーナル・オブ・アプライド・フィジックス、パート2、32巻、L614～L615、1993年 Ogawaら、に示されるように上限が $160^{\circ}$ 程度となる場合もある。

[0178] また、この細胞接着阻害材料にエネルギーを照射し、細胞との接着性を有するものとする場合には、水との接触角が $10^{\circ}$ ～ $40^{\circ}$ 、中でも $15^{\circ}$ ～ $30^{\circ}$ の範囲内とするようにエネルギーが照射されることが好ましい。これにより、細胞との接着性を高いも

のとすることができるからである。なお、上記水との接触角は、上述した方法により得ることができる。

[0179] また、上記のオルガノポリシロキサン等とともに、ジメチルポリシロキサンのような架橋反応をしない安定なオルガノシリコン化合物を別途混合してもよい。

[0180] 上記のような反応性シリコーンを用いることにより、撥水性や撥油性を高いものとすることができ、細胞との相互作用が小さく、細胞との接着性が低いものとすることができる。また、上記のような材料にエネルギーが照射された場合には、容易に置換基を除去して表面にOH基等を導入することができ、細胞との相互作用を大きなものとすることから、細胞との接着性を良好なものとすることができるのである。

[0181] このような細胞接着阻害材料は、光触媒含有細胞接着阻害層中に0.01重量%〜95重量%、中でも1重量%〜10重量%の範囲内含有されることが好ましい。これにより、細胞接着阻害材料を含有する領域を細胞との接着性が低い領域とすることができるからである。

[0182] なお、上記細胞接着阻害材料は、界面活性を有することが好ましい。例えば、上記細胞接着阻害材料を含有する光触媒含有細胞接着阻害層形成用塗工液等を塗布した後、乾燥させる際等に、塗膜表面に偏在する割合が高まり、結果として良好な細胞接着阻害性を得られるからである。

[0183] b. その他

また、本態様の光触媒含有細胞接着阻害層には、例えば層を形成する際の塗工性や、層を形成した際の強度や耐性等、必要とされる特性に合わせてバインダ等が含有されていてもよい。また、上記細胞接着阻害材料が上記バインダとしての機能を果たすものであってもよい。

[0184] このようなバインダとしては、例えば主骨格が上記光触媒の作用により分解されないような高い結合エネルギーを有するものを用いることができる。具体的には、有機置換基を有しない、もしくは接着性に影響を与えない程度の有機置換基を有するポリシロキサン等を挙げることができ、これらはテトラメトキシシラン、テトラエトキシシラン等を加水分解、重縮合することにより得ることができる。

[0185] 本態様においては、このようなバインダは、光触媒含有細胞接着阻害層中に5重量

%～95重量%、中でも40重量%～90重量%、特に60重量%～80重量%の範囲内含有されることが好ましい。これにより、光触媒含有細胞接着阻害層の形成を容易としたり、光触媒含有細胞接着阻害層に強度を付与する等、特性を発揮することが可能となるからである。

[0186] また、本態様においては特に、上記光触媒含有細胞接着阻害層中に、少なくともエネルギー照射された後に、細胞と接着性を有する細胞接着材料が含有されることが好ましい。これにより、光触媒含有細胞接着阻害層が、エネルギーが照射された領域である細胞接着部、すなわち細胞接着層の細胞との接着性をより良好なものとすることができるからである。このような細胞接着材料としては、上記バインダとして用いられるものであってもよく、また、バインダと別に使用されるものであってもよい。また例えば、エネルギー照射される前から細胞と良好な接着性を有するものであってもよく、エネルギー照射に伴う光触媒の作用によって、細胞と良好な接着性を有するものとなるものであってもよい。ここで、上記細胞と接着性を有するとは、細胞と良好に接着することをいい、細胞との接着性が細胞の種類によって異なる場合等には、目的とする細胞と良好に接着することをいう。

[0187] 本態様においては、少なくともエネルギー照射された後に、上記細胞接着材料が細胞と良好な接着性を有するものであれば、細胞との接着が、例えば疎水性相互作用や、静電的相互作用、水素結合、ファンデルワールス力等の物理的相互作用により良好なものとするものであってもよく、生物学的特性により、良好なものとするものであってもよい。

[0188] 本態様においては、このような細胞接着材料は、光触媒含有細胞接着阻害層中に0.01重量%～95重量%、中でも1重量%～10重量%の範囲内含有されることが好ましい。これにより、光触媒含有細胞接着阻害層が、エネルギー照射された領域である細胞接着層の細胞との接着性をより良好なものとすることができるからである。また、エネルギー照射される前から細胞と良好な接着性を有する材料を細胞接着材料として用いる場合には、エネルギー照射されない領域、すなわち細胞接着補助部となる領域における上記細胞接着阻害材料の細胞接着阻害性を阻害しない程度含有されることが好ましい。



[0189] c. 細胞接着層の形成方法

次に、細胞接着層の形成方法について説明する。本態様においては、例えば図11に示すように、基材1上の細胞培養領域上に形成された上記細胞接着阻害材料および光触媒を含有する光触媒含有細胞接着阻害層8に、例えばフォトマスク5等を用いてエネルギー6を、細胞接着層（細胞接着部）を形成するパターン状に照射する（図11(a)）。これにより、エネルギー照射された領域を細胞接着阻害材料が分解または変性されてい細胞との接着性を有する細胞接着層（細胞接着部）7とすることができ、エネルギー照射されていない領域を細胞と接着することを阻害する細胞接着補助部4とすることができるのである。この際、細胞接着部には、光触媒、および細胞接着阻害材料の分解物や変性物等が含有されることとなる。

[0190] ここで、本態様でいうエネルギー照射（露光）とは、エネルギー照射に伴う光触媒の作用によって、細胞接着阻害材料を分解または変性させることが可能ないかなるエネルギー線の照射をも含む概念であり、光の照射に限定されるものではない。

[0191] なお、このようなエネルギー照射の方法等については、上述した「I. (1)の場合」の第1の態様で説明したものと同様であるので、ここでの詳しい説明は省略する。

[0192] (2) 第2の態様

次に、少なくとも細胞接着阻害材料を含有する細胞接着阻害層が、光触媒を少なくとも含有する光触媒処理層上に形成されており、細胞接着層を形成するパターン状に、エネルギーを照射することにより細胞接着阻害材料が分解または変性された細胞接着層とする場合について説明する。

[0193] 本態様においては、上記細胞接着阻害層が光触媒処理層上に形成されていることから、細胞接着阻害層にエネルギー照射をすることにより、光触媒処理層中に含有される光触媒が励起され、細胞接着阻害層中の細胞接着阻害材料を分解または変性することができ、細胞接着部（細胞接着層）を形成することができるのである。またこの際、エネルギーが照射されず、細胞接着阻害材料が残存する領域を細胞接着補助部とすることができる。

[0194] ここで、上記細胞接着阻害材料が分解または変性されているとは、上記細胞接着阻害材料が含有されていない、もしくは上記細胞接着補助層に含有される細胞接着

阻害材料の量と比較して、細胞接着阻害材料が少ない量含有されていることをいう。例えば上記細胞接着阻害材料がエネルギー照射に伴う光触媒の作用により分解されるものである場合には、細胞接着部中にはその細胞接着阻害材料が少量含有されている、または細胞接着阻害材料の分解物等が含有されていること等となる。また、上記細胞接着阻害材料がエネルギー照射に伴う光触媒の作用により変性されるものである場合には、細胞接着部中にはその変性物等が含有されていることとなる。本態様においては、上記細胞接着部に、少なくともエネルギー照射された後に、細胞との接着性を有する細胞接着物質が含有されていることが好ましい。これにより、細胞接着部の細胞との接着性をより高いものとすることができ、上記細胞接着部のみに、高精細に細胞を接着させることが可能となるからである。

[0195] 以下、本態様に用いられる細胞接着阻害層について説明する。なお、本態様に用いられる光触媒処理層については、上述した「I. (1)の場合」の第2の態様で説明したものと同様のものを用いることができ、また細胞接着層の形成方法については、上記の第1の態様と同様とすることができるので、ここでの説明は省略する。

[0196] (細胞接着阻害層)

本態様に用いられる細胞接着阻害層は、上記光触媒処理層上に形成されるものであり、細胞と接着することを阻害する細胞接着阻害性を有しかつエネルギー照射に伴う光触媒の作用により分解または変性される細胞接着阻害材料を含有するものであれば特に限定されるものである。

[0197] 本態様においては、このような層が形成可能であれば、その形成方法等は特に限定されるものではなく、例えば、上記細胞接着阻害材料を含有する細胞接着阻害層形成用塗工液を、一般的な塗布方法により細胞培養領域に塗布することにより、形成することができる。また、このような細胞接着阻害層の膜厚は、細胞培養用パターンニング基板の種類等によって適宜選択されるものであるが、通常 $0.001\ \mu\text{m}$ 〜 $1.0\ \mu\text{m}$ 程度、中でも $0.005\ \mu\text{m}$ 〜 $0.3\ \mu\text{m}$ 程度とすることができる。

[0198] ここで、本態様において形成される細胞接着阻害層に用いられる具体的な細胞接着阻害材料としては、第1の態様で説明した光触媒含有細胞接着阻害層に用いられる細胞接着阻害材料と同様のものを用いることができるので、ここでの詳しい説明は

省略する。また、本態様の細胞接着阻害層にも、第1の態様で説明した光触媒含有細胞接着阻害層で説明した細胞接着性を有する材料が含有されていることが好ましい。これにより、エネルギー照射された領域である細胞接着部(細胞接着層)の細胞との接着性を高いものとすることができるからである。

[0199] (3) 第3の態様

次に、少なくとも細胞接着阻害材料を含有する細胞接着阻害層が基材上に形成されており、この細胞接着阻害層と、少なくとも光触媒を含有する光触媒含有層等を細胞接着阻害層と対向させて、細胞接着層を形成するパターン状にエネルギーを照射することによって、細胞接着阻害材料が分解または変性された細胞接着層とする場合について説明する。

[0200] 本態様においては、上記細胞接着阻害層中に、エネルギー照射に伴う光触媒の作用により分解または変性される細胞接着阻害材料が含有されていることから、細胞接着阻害層と光触媒含有層とを対向させて配置し、細胞接着層(細胞接着部)を形成するパターン状にエネルギーを照射することにより、細胞光触媒含有層中の光触媒の作用により、細胞接着阻害層中の細胞接着阻害材料が分解または変性されて、細胞接着層(細胞接着部)を形成することができるのである。この際、エネルギーが照射されていない領域については、細胞接着阻害材料が残存することから、細胞と接着することを阻害するものとすることができ、細胞接着補助部として用いることができるのである。

[0201] ここで、上記細胞接着阻害材料が分解または変性されているとは、上記細胞接着阻害材料が含有されていない、もしくは上記細胞接着補助層に含有される細胞接着阻害材料の量と比較して、細胞接着阻害材料が少ない量含有されていることをいう。例えば上記細胞接着阻害材料がエネルギー照射に伴う光触媒の作用により分解されるものである場合には、細胞接着部(細胞接着層)中にはその細胞接着阻害材料が少量含有されている、または細胞接着阻害材料の分解物等が含有されていること等となる。また、上記細胞接着阻害材料がエネルギー照射に伴う光触媒の作用により変性されるものである場合には、細胞接着部中にはその変性物等が含有されていることとなる。本態様においては、上記細胞接着部に、少なくともエネルギー照射され

た後に、細胞との接着性を有する細胞接着物質が含有されていることが好ましい。これにより、細胞接着部の細胞との接着性をより高いものとすることができ、上記細胞接着部のみに、高精細に細胞を接着させることが可能となるからである。

[0202] なお、本態様に用いられる細胞接着阻害層は、上記第2の態様で説明した細胞接着阻害層と同様であり、光触媒含有層側基板およびその配置については、「I. (1) の場合」の第3の態様で説明したものと同様であるので、ここでの詳しい説明は省略する。また、エネルギーの照射方法等については、上記第1の態様と同様であるのでここでの説明は省略する。

[0203] B. 第2実施態様

次に、本発明の細胞培養用パターンニング基板の第2実施態様について説明する。本発明の細胞培養用パターンニング基板の第2実施態様は、基材と、上記基材上に形成され、細胞を培養する領域であり、かつ細胞と接着性を有する細胞接着層を含有する細胞培養領域とを有する細胞培養用パターンニング基板であって、

上記細胞接着層は、端部が凹凸を有するパターン状に形成されているものである。

本実施態様における細胞培養用パターンニング基板は、例えば図12に示すように、基材1と、その基材1上に形成された細胞培養領域2を有するものであって、細胞培養領域2に形成されている細胞接着層7の端部aが、凹凸を有するパターン状に形成されているものである。

[0204] 上述したように、細胞培養領域に細胞を付着させた際、細胞は端部から形態変化を伴って規則的に配列し、組織が形成される。ここで、細胞を培養する際、直線的な線に沿って細胞を付着させる場合と、凹凸を有する線に沿って細胞を付着させる場合とでは、凹凸を有する線に沿って細胞を付着させる場合の方が、細胞の形態変化が活発化し、かつ規則的に配列することが可能となる。本実施態様によれば、細胞が配列を開始する細胞接着層の端部が凹凸を有するパターン状に形成されていることから、その端部に付着した細胞を活性化することができ、また細胞を規則的に良好に配列させることが可能となるのである。

[0205] 以下、本実施態様における細胞培養用パターンニング基板の各構成について説明する。なお、本実施態様に用いられる基材については、上述した第1実施態様で用

いられるものと同様であるので、ここでの詳しい説明は省略する。

[0206] 1. 細胞培養領域

まず、本実施態様の細胞培養用パターンニング基板における細胞培養領域について説明する。本実施態様の細胞培養用パターンニング基板における細胞培養領域とは、細胞を培養する領域であって、端部に凹凸を有するパターン状に形成された細胞接着層を有するものであれば、特に限定されるものではない。

[0207] ここで、細胞培養領域は、上記基材上に形成され、基材の細胞培養領域以外の部分は、細胞と接着することを阻害する細胞非培養領域とされる。また、上記細胞接着層の端部とは、通常、この細胞培養領域と細胞非培養領域との境界となる(図12において、aで示される)。

[0208] 本実施態様においては、この細胞培養領域に形成される細胞接着層の端部全部を、凹凸を有するものとしてもよく、また例えば図12に示すように、端部のうち、一部のみを凹凸を有するものとしてもよい。

[0209] このように細胞接着層の端部に形成される凹凸としては、細胞接着層に付着した細胞が、規則的に配列することが可能な程度のものであることが好ましく、特に凹部端から凸部端までの距離が、細胞接着層に細胞を付着させた際、細胞が直線的に整列する大きさで形成されていることが好ましい。

[0210] 具体的な凹凸の大きさとしては、培養する細胞の形状等によって適宜選択されるものであるが、通常、凹凸の凹部端から凸部短までの距離の平均が $0.5\mu\text{m}$ ～ $30\mu\text{m}$ 、中でも $1\mu\text{m}$ ～ $5\mu\text{m}$ の範囲内であることが好ましい。これにより、細胞を培養した際、細胞培養領域の端部において細胞が欠けることなく、目的とする形状に細胞を培養し、組織を形成することが可能となるからである。ここで、上記凹凸の凹部端から凸部端までの距離の平均の測定は、細胞接着部と細胞接着補助部の境界 $200\mu\text{m}$ の範囲における各凹凸の最底部から最頂部までの距離を測定し、その平均を算出した値である。

[0211] このような端部を有する細胞接着層としては、細胞と接着性を有する層であれば、特に限定されるものではない。またこの細胞接着層の形成方法としても、上記端部を形成することが可能な方法であれば、特に限定されるものではなく、例えば細胞と接

着性を有する材料を含有する細胞接着層形成用塗工液等を一般的な印刷法により塗布する方法や、上記細胞接着層形成用塗工液を塗布した後、フォトリソグラフィ法等によってパターニングする方法等が挙げられる。また、本実施態様においては、上記第1実施態様で説明したように、エネルギー照射に伴う光触媒の作用により分解または変性される細胞接着性材料を含有する細胞接着層を形成し、エネルギー照射によって、細胞接着層をパターニングしてもよい。またさらに、上記第1実施態様で説明したように、細胞との接着阻害性を有する細胞接着阻害材料を含有する細胞接着阻害層を形成し、エネルギー照射に伴う光触媒の作用により、この細胞接着阻害材料を分解または変性させて、細胞接着層が形成されたものであってもよい。

[0212] これらの方法や材料等については、上記第1実施態様と同様であるので、ここでの詳しい説明は省略する。

[0213] ここで、本実施態様においても、上述した細胞培養領域に、上述した第1実施態様で説明した細胞接着補助部が形成されていることが好ましい。これにより、効率よく細胞を培養して、大面積の組織等を形成することが可能となるからである。

## [0214] 2. 細胞培養用パターニング基板

次に、本実施態様の細胞培養用パターニング基板について説明する。本実施態様の細胞培養用パターニング基板は、上述した基材上に上記端部を有する細胞接着層が形成されているものであれば、特に限定されるものではなく、必要に応じて、例えば遮光部等の部材が形成されているものであってもよい。

[0215] なお、本発明は上記実施形態に限定されるものではない。上記実施形態は、例示であり、本発明の特許請求の範囲に記載された技術的思想と実質的に同一な構成を有し、同様な作用効果を奏するものは、いかなるものであっても本発明の技術的範囲に包含される。

## 実施例

[0216] 以下に実施例を示し、本発明をさらに具体的に説明する。

### [実施例1]

#### <光触媒含有層を有するフォトマスクの形成>

開口部の幅が $60\mu\text{m}$ 、遮光部の幅が $300\mu\text{m}$ の、 $60\mu\text{m}/300\mu\text{m}$ のライン&ス

ペースを有し、その開口部と遮光部との境界が $1\mu\text{m}$ 角の凹凸を有するように形成されたフォトマスクを形成した。

次に、トリメトキシメチルシランTSL8114(GE東芝シリコン社製)5gと0.5規定塩酸2.5gとを混合し、8時間攪拌した。これをイソプロピルアルコールにより10倍に希釈し、プライマー層用組成物とした。このプライマー層用組成物をフォトマスクのパターン面上にスピコーティング法により塗布し、その基板を $150^{\circ}\text{C}$ の温度で10分間乾燥することにより、プライマー層を形成した。

次に、イソプロピルアルコール30gとトリメトキシメチルシランTSL8114(GE東芝シリコン社製)3gと光触媒無機コーティング剤ST-K03(石原産業)20gとを混合し、 $100^{\circ}\text{C}$ で20分間攪拌した。これをイソプロピルアルコールにより3倍希釈し、光触媒含有層用組成物とした。この光触媒含有層用組成物を、プライマー層が形成されたフォトマスク基板上にスピコーターにより塗布し、 $150^{\circ}\text{C}$ で10分間の乾燥処理を行うことにより、透明な光触媒含有層を有するフォトマスクを形成した。

[0217] <細胞培養用パターンニング基板の作成方法>

(細胞接着阻害層の形成)

オルガノシランTSL-8114(GE東芝シリコン社製)5.0g、フルオロアルキルシランTSL-8233(GE東芝シリコン社製)1.5g、0.005N塩酸2.36gを混合し、24時間攪拌した。この溶液をイソプロピルアルコールで100倍希釈の上、スピコーティング法により予めアルカリ処理をした石英基板に塗布し、その基板を $150^{\circ}\text{C}$ の温度で10分間乾燥することにより、加水分解、重縮合反応を進行させ、膜厚 $0.2\mu\text{m}$ の細胞接着阻害層を有する基板を得た。

[0218] (パターンニング用基板のパターンニング)

この基板の細胞接着阻害層と前述の光触媒含有層を有するフォトマスクの光触媒含有層とを対向させ、フォトマスク越しに水銀ランプにより $6\text{J}/\text{cm}^2$ のエネルギー量で紫外線露光を行い、未露光部が細胞接着阻害性を有し、露光部が細胞接着性を有するようにパターン化された細胞接着性表面を有する細胞培養用パターンニング基板を得た。

[0219] (細胞の培養)

10%ウシ胎児血清を加えたDMEM培地中に上記細胞培養用パターンニング基板を浸漬し、初代人臍静脈細胞 (HUVEC) を播種した。37℃、5%二酸化炭素環境下で16時間培養し、細胞を細胞接着部に接着した。

細胞培養基板に接着した細胞を観察したところ、細胞が細胞培養領域中全領域に沿う方向に配向し、更に伸展形状を示す事を確認した。

更にDMEM培地を、bFGF(シグマ社) 10ng/mlの濃度で加えたものに交換、37℃、5%二酸化炭素環境下で24時間培養を継続し、細胞が連続したキャピラリー組織を形成した事を確認した。

[0220] [比較例1]

フォトマスクを60  $\mu$ m/300  $\mu$ mのライン&スペースのみで開口部と遮光部との境界部に凹凸を持たないものとした以外は、実施例1と同様に細胞の培養を行ったところ、細胞播種後16時間での、基板に対する細胞の接着は実施例1よりも少ないことを確認した。培養を24時間後まで行ったところ、基板に接着した細胞数は増えたが、細胞の配向、進展形状の度合いは実施例1よりも劣る事を確認した。

更にDMEM培地に実施例1と同様にbFGFを加え、細胞の組織化を行ったところ、細胞のキャピラリー形成は行われたが、実施例1と比較し、キャピラリーの長さは短く、組織形成が不完全である事を確認した。

[0221] [実施例2]

開口部の幅が190  $\mu$ m、遮光部の幅が500  $\mu$ mの、190  $\mu$ m/500  $\mu$ mのライン&スペースを有し、上記開口部内には、幅60  $\mu$ mごとに5  $\mu$ mの遮光部が形成されているフォトマスクを作製して用いた以外は、実施例1と同様に細胞の培養を行った。

細胞の播種16時間後に細胞の形態を観察したところ、細胞培養領域の全ての細胞について、細胞の配向、伸展が観察された。

[0222] [比較例2]

190  $\mu$ m/500  $\mu$ mのライン&スペースのフォトマスクを用いた以外は、実施例2と同様に細胞の培養を行った。この場合、細胞の播種24時間後でも、細胞接着部中央付近の細胞は基板に接着するものの、配向や伸展はしない事が確認された。

[0223] [実施例3]



(光触媒含有細胞接着層の形成)

イソプロピルアルコール3g、オルガノシランTSL8114(GE東芝シリコン社製)0.4g、N-(2-アミノエチル)-3-アミノプロピルトリメトキシシラン(Huels America社製)0.04g、および光触媒無機コーティング剤ST-K01(石原産業社製)1.5gを混合し、攪拌しながら20分間、100℃で加温した。

この溶液をスピコーティング法により予めアルカリ処理を施した石英ガラス基板に塗布し、その基板を温度150℃で10分間乾燥させて、加水分解および重縮合反応を進行させ、光触媒がオルガノポリシロキサン中に強度に固定された膜厚0.2  $\mu\text{m}$ の、エネルギー照射に伴う光触媒の作用により細胞接着性から細胞接着阻害性に変化する光触媒含有細胞接着層を有するパターンニング用基板を形成した。

[0224] (パターンニング用基板のパターンニング)

このパターンニング用基板に、開口部の幅が60  $\mu\text{m}$ 、遮光部の幅が300  $\mu\text{m}$ の、60  $\mu\text{m}$ /300  $\mu\text{m}$ のライン&スペースを有し、その開口部と遮光部との境界が1  $\mu\text{m}$ 角の凹凸を有するように形成されたフォトマスクを用いて水銀ランプ(波長365nm)により300mW/cm<sup>2</sup>の照度で900秒間紫外線露光を行い、未露光部が細胞接着性を有し、露光部が細胞接着阻害性を有するようにパターン化された細胞接着性表面を有する細胞培養用パターンニング基板を得た。

[0225] (細胞の培養)

実施例1と同様に細胞を培養し、細胞の播種16時間後に細胞の形態を観察したところ、細胞培養領域の全ての細胞について、細胞の配向、伸展が観察された。

[0226] [実施例4]

(光触媒含有細胞接着阻害層の形成)

イソプロピルアルコール3g、オルガノシランTSL8114(GE東芝シリコン社製)0.4g、フルオロアルキルシランTSL8233(GE東芝シリコン社製)0.04g、光触媒無機コーティング剤ST-K01(石原産業社製)1.5gを混合し、攪拌しながら20分間、100℃で加温した。

[0227] この溶液をスピコーティング法により予めアルカリ処理を施した石英ガラス基板に塗布し、その基板を温度150℃で10分間乾燥させて、加水分解および重縮合反応

を進行させ、光触媒がオルガノポリシロキサン中に強度に固定された膜厚 $0.2\mu\text{m}$ の、エネルギー照射に伴う光触媒の作用により細胞接着阻害性から細胞接着性に変化する光触媒含有細胞接着阻害層を有するパターンニング用基板を形成した。

[0228] (パターンニング用基板のパターンニング)

上記パターンニング用基板に実施例3と同様に紫外線照射を行い、未露光部が細胞接着阻害部、露光部が細胞接着部となるパターンを有する細胞培養用パターンニング基板を得た。

[0229] (細胞の培養)

実施例1と同様に細胞を培養し、細胞の播種16時間後に細胞の形態を観察したところ、細胞培養領域の全ての細胞について、細胞の配向、伸展が観察された。

[0230] [実施例5]

(光触媒含有層の形成)

イソプロピルアルコール3g、オルガノシランTSL8114(GE東芝シリコン社製)0.4g、および光触媒無機コーティング剤ST-K01(石原産業)1.5gを混合し、攪拌しながら20分間、 $100^{\circ}\text{C}$ で加温した。

この溶液をスピンコーティング法により予めアルカリ処理を施した石英ガラス基板に塗布し、その基板を $150^{\circ}\text{C}$ の温度で10分間乾燥することにより、加水分解、重縮合反応を進行させ、光触媒がオルガノポリシロキサン中に強固に固定された膜厚 $0.2\mu\text{m}$ の光触媒含有層を基板上に形成した。

[0231] (細胞接着層の形成)

フィブロネクチンF-4759(シグマ)0.2mgと、純水200mlとを混合し、この水溶液を上記光触媒含有層を設けた基板の光触媒含有層に対し、基板面積 $1\text{cm}^2$ 当たり300 $\mu\text{l}$ の比率で滴下し、これを $4^{\circ}\text{C}$ 下で24時間静置した。更に基板をPBSにて2回洗浄の上、窒素ガスにさらし乾燥する事により、基板上に光触媒含有層と細胞接着層を有するパターンニング用基板を得た。

[0232] (パターンニング用基板のパターンニング)

上記パターンニング用基板に実施例3と同様に紫外線照射を行い、未露光部が細胞接着部、露光部が細胞接着阻害部となるパターンを有する細胞培養用パターンニング

基板を得た。

[0233] (細胞の培養)

実施例1と同様に細胞を培養し、細胞の播種16時間後に細胞の形態を観察したところ、細胞培養領域の全ての細胞について、細胞の配向、伸展が観察された。

[0234] [実施例6]

(光触媒含有層の形成)

イソプロピルアルコール3g、オルガノシランTSL8114(GE東芝シリコン社製)0.4g、および光触媒無機コーティング剤ST-K01(石原産業)1.5gを混合し、攪拌しながら20分間、100℃で加温した。

この溶液をスピコーティング法により予めアルカリ処理を施した石英ガラス基板に塗布し、その基板を150℃の温度で10分間乾燥することにより、加水分解、重縮合反応を進行させ、光触媒がオルガノポリシロキサン中に強固に固定された膜厚0.2  $\mu\text{m}$ の光触媒含有層を基板上に形成した。

[0235] (細胞接着阻害層の形成)

この基板にイソプロピルアルコール5g、オルガノシランTSL8114(GE東芝シリコン社製)0.4g、およびフルオロアルキルシランTSL8233(GE東芝シリコン社製)0.04gから成る溶液をスピコーティングにより塗布し、その後基板を150℃で10分間乾燥することにより細胞接着阻害層を形成した。

[0236] (パターニング用基板のパターニング)

上記パターニング用基板に実施例3と同様に紫外線照射を行い、未露光部が細胞接着阻害部、露光部が細胞接着部となるパターンを有する細胞培養用パターニング基板を得た。

[0237] (細胞の培養)

実施例1と同様に細胞を培養し、細胞の播種16時間後に細胞の形態を観察したところ、細胞培養領域の全ての細胞について、細胞の配向、伸展が観察された。

[0238] [実施例7]

(細胞接着層の形成)

イソプロピルアルコール3g、オルガノシランTSL8114(GE東芝シリコン社製)0.

4g、およびアミノプロピルトリエトキシシラン0.4gを混合し、攪拌しながら20分間、100°Cで加温した。この溶液をスピンコーティング法により予めアルカリ処理を施した石英ガラス基板に塗布し、その基板を150°Cの温度で10分間乾燥することにより、加水分解、重縮合反応を進行させ、膜厚が約80nmの、アミノ基を含むオルガノポリシロキサン層を基板上に形成し、パターニング用基板とした。

[0239] (パターニング用基板のパターニング)

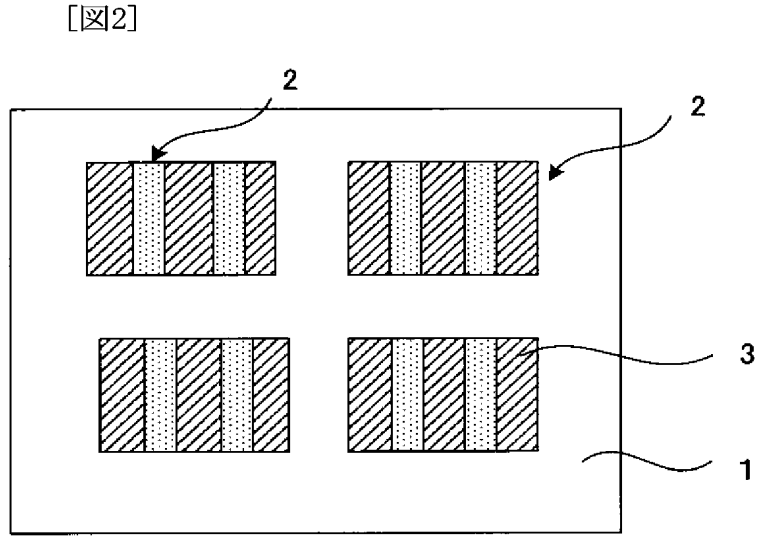
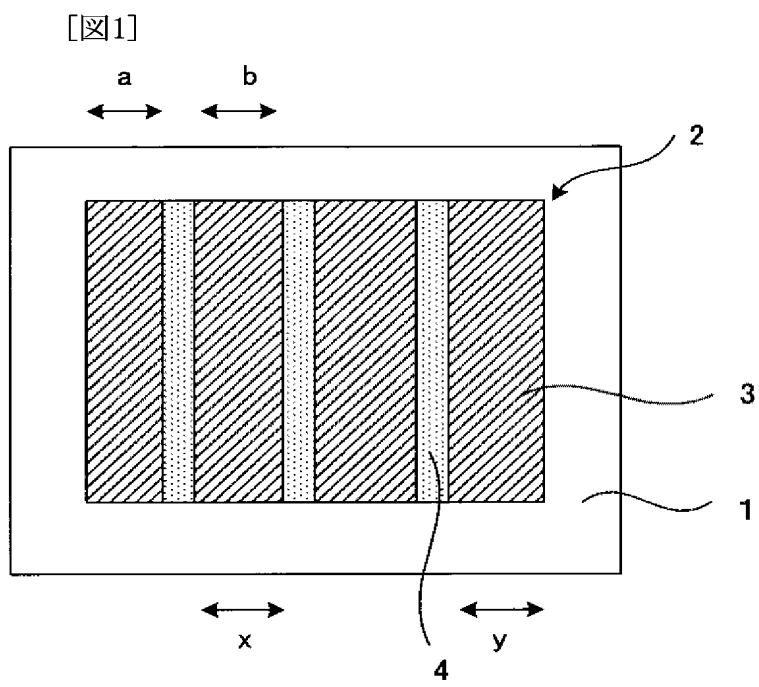
上記パターニング用基板に実施例1と同様に紫外線照射を行い、未露光部が細胞接着部、露光部が細胞接着阻害部となるパターンを有する細胞培養用パターニング基板を得た。

[0240] (細胞の培養)

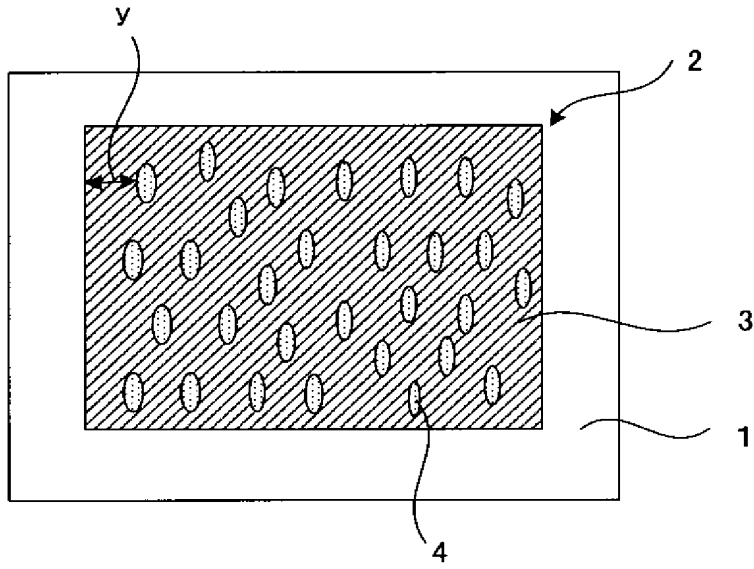
実施例1と同様に細胞を培養し、細胞の播種16時間後に細胞の形態を観察したところ、細胞培養領域の全ての細胞について、細胞の配向、伸展が観察された。

### 請求の範囲

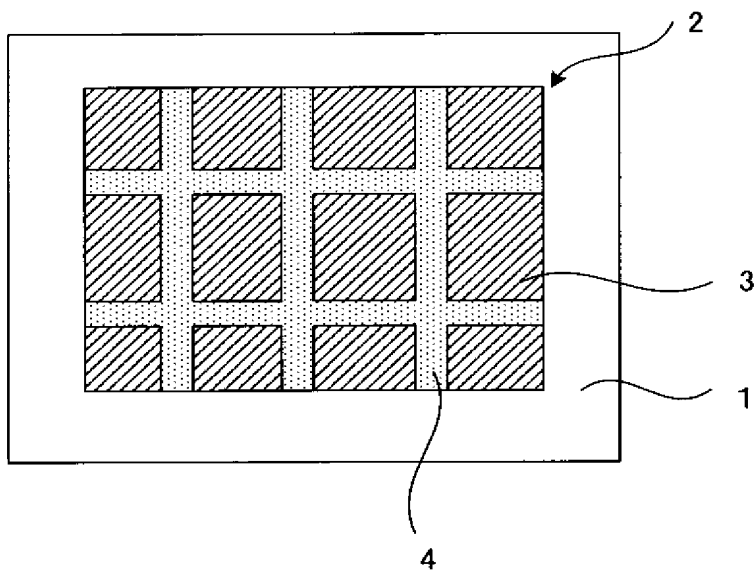
- [1] 基材と、前記基材上に形成され、細胞を培養する領域であり、かつ細胞と接着性を有する細胞接着層を含有する細胞培養領域とを有する細胞培養用パターンニング基板であって、
- 前記細胞培養領域は、前記細胞接着層が形成された細胞接着部と、パターン状に形成され、かつ細胞と接着することを阻害する細胞接着補助部とを有し、前記細胞接着補助部は、前記細胞接着部に細胞を付着させた際、前記細胞接着補助部に隣接する2つの前記細胞接着部上の細胞どうしが、前記細胞接着補助部上で結合し得るように形成されていることを特徴とする細胞培養用パターンニング基板。
- [2] 前記細胞接着補助部が、前記細胞培養領域内でライン状に形成されていることを特徴とする請求項1に記載の細胞培養用パターンニング基板。
- [3] 前記細胞接着補助部と前記細胞接着部との境界が凹凸を有するパターン状に形成されていることを特徴とすることを特徴とする請求項1または請求項2に記載の細胞培養用パターンニング基板。
- [4] 基材と、前記基材上に形成され、細胞を培養する領域であり、かつ細胞と接着性を有する細胞接着層を含有する細胞培養領域とを有する細胞培養用パターンニング基板であって、
- 前記細胞接着層は、端部が凹凸を有するパターン状に形成されていることを特徴とする細胞培養用パターンニング基板。
- [5] 前記凹凸の凹部端から凸部端までの距離が、前記細胞接着層上に細胞を付着させた際、細胞が直線的に整列する大きさであることを特徴とする請求項4に記載の細胞培養用パターンニング基板。
- [6] 前記凹凸の凹部端から凸部端までの距離の平均が $0.5\mu\text{m}$ ～ $30\mu\text{m}$ の範囲内であることを特徴とする請求項4または請求項5に記載の細胞培養用パターンニング基板。
- 。



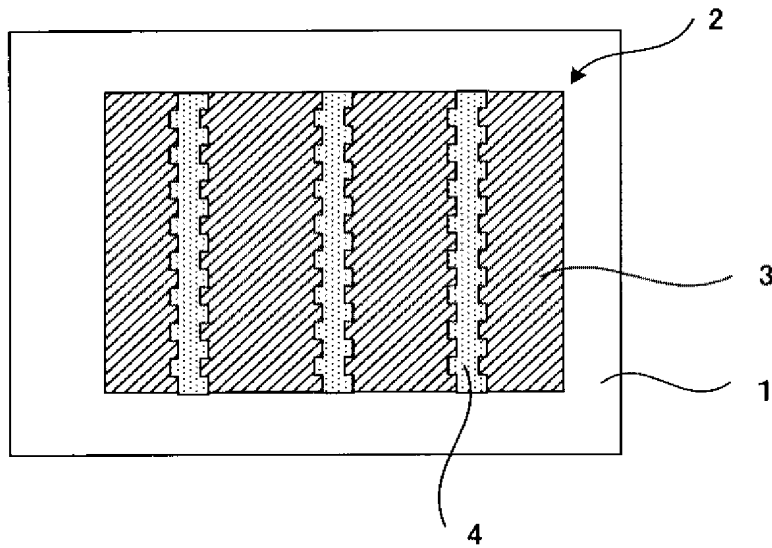
[図3]



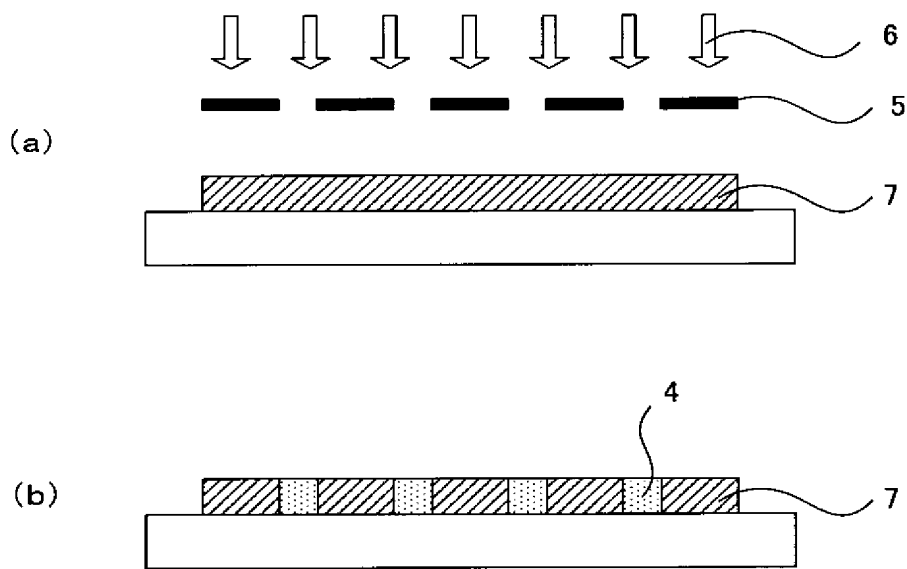
[図4]



[[図5]]



[[図6]]

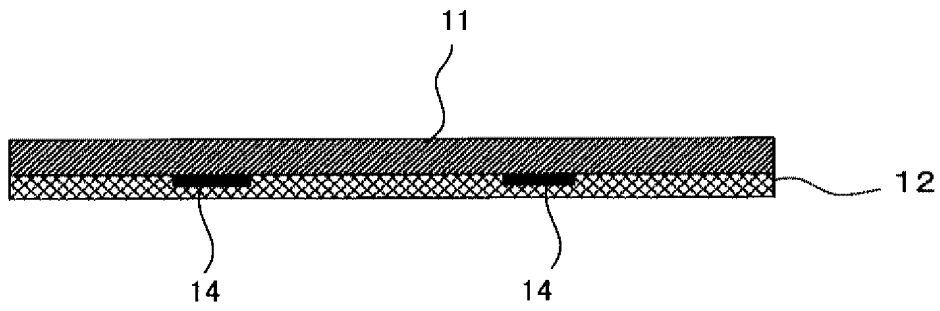


[[図7]]

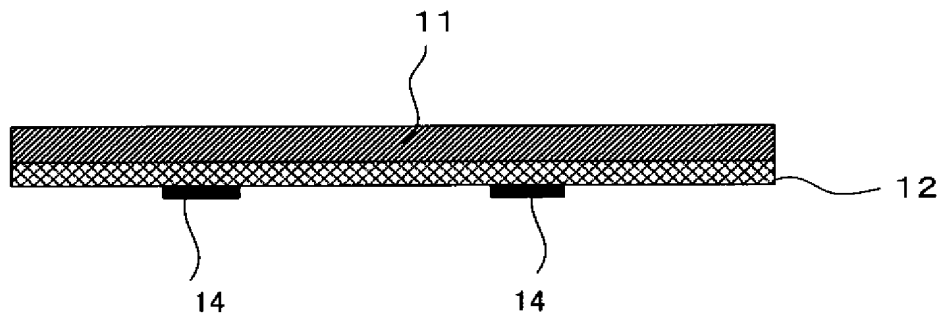




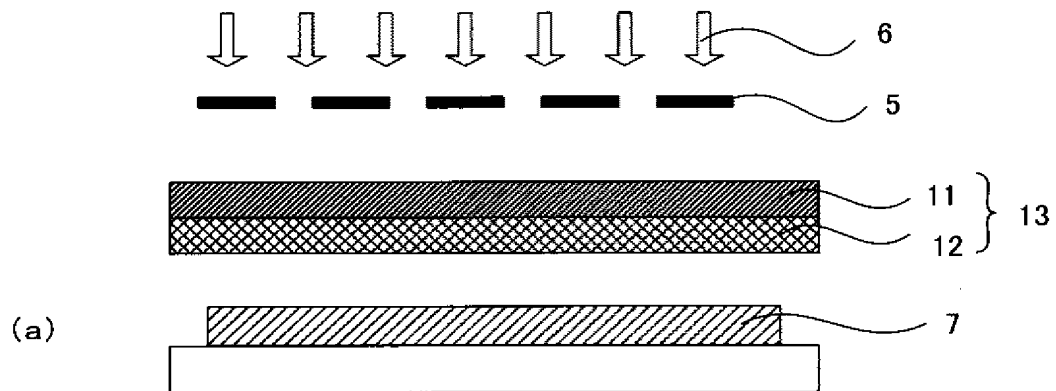
[[8]]



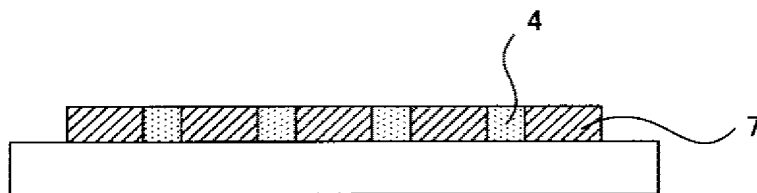
[[9]]



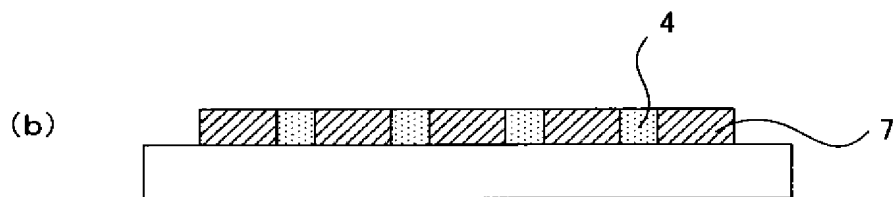
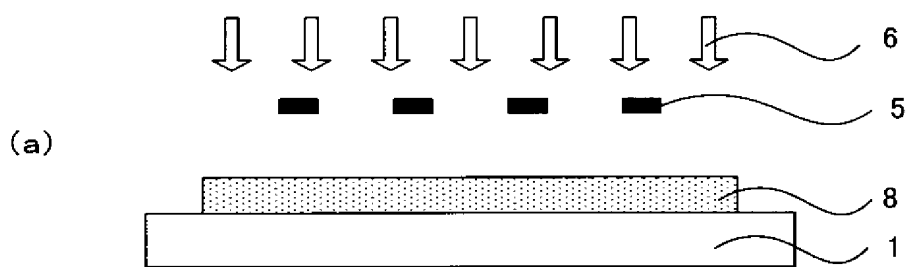
[[10]]



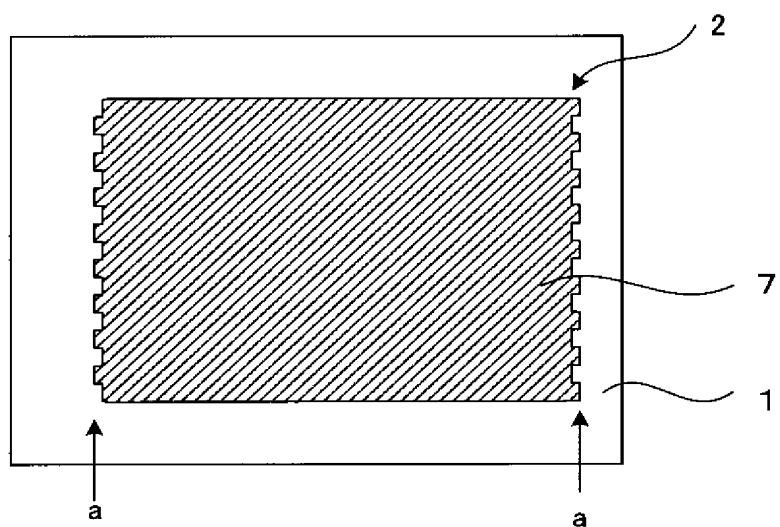
(b)



[図11]



[図12]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/002608

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
Int.Cl<sup>7</sup> C12M3/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12M1/00-3/10

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus (JOIS), Igaku·Yakugaku Yokoshu (web)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 3-7576 A (Kaneka Corp.), 14 January, 1991 (14.01.91), & EP 402718 B1 & US 5593814 A	1-6
A	JP 4-126074 A (Biomaterial Research Institute Co., Ltd.), 27 April, 1992 (27.04.92), (Family: none)	1-6
A	JP 2003-325163 A (Sumitomo Bakelite Co., Ltd.), 18 November, 2003 (18.11.03), (Family: none)	1-6

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
28 April, 2005 (28.04.05)Date of mailing of the international search report  
17 May, 2005 (17.05.05)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/002608

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2003-9860 A (Fuji Photo Film Co., Ltd.), 14 January, 2003 (14.01.03), (Family: none)	1-6
A	JP 7-75547 A (Biomaterial Research Institute Co., Ltd.), 20 March, 1995 (20.03.95), (Family: none)	1-6

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2005/002608

**Box No. II      Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III      Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See extra sheet.

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/002608

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

<<Reference>>

1. JP 3-7576 A

The invention of claims 1-3 is in common with the invention of claims 4-6 in "patterning substrate for cell culture, comprising a base material and, superimposed thereon, a cell culture region being a region for cell incubation and including a cell adhesive layer having adherence to cells."

On the other hand, the reference (1) describes a cell arrangement controlling tool characterized by having an arrangement pattern composed of a cell adherent surface and a cell nonadherent surface (namely, "patterning substrate for cell culture", see claim 1, etc.), and describes that in the arrangement controlling tool, a patterned cell adherent surface and cell nonadherent surface are formed on a surface of material of arrangement controlling tool (namely, "base material") (see page 2, right lower column, lines 9-12).

Consequently, it does not appear that the invention of claims 1-3 and the invention of claims 4-6 share a technical feature contributory over the prior art, and it does not appear that they are linked with each other so as to form a single general inventive concept.

Therefore, this application involves two inventions consisting of the invention of claims 1-3 and the invention of claims 4-6.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.<sup>7</sup> C12M3/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.<sup>7</sup> C12M1/00-3/10

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus (JOIS), 医学・薬学予稿集 (web)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 3-7576 A (鐘淵化学工業株式会社) 1991. 01. 14 & EP 402718 B1 & US 5593814 A	1-6
A	JP 4-126074 A (株式会社バイオマテリアル研究所) 1992. 04. 27 (ファミリーなし)	1-6
A	JP 2003-325163 A (住友ベークライト株式会社) 2003. 11. 18 (ファミリーなし)	1-6

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

28. 04. 2005

国際調査報告の発送日

17. 5. 2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

三原 健治

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

4N

3228

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 2003-9860 A (富士写真フイルム株式会社) 2003. 01. 14 (ファミリーなし)	1-6
A	JP 7-75547 A (株式会社バイオマテリアル研究所) 1995. 03. 20 (ファミリーなし)	1-6



## 第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。  
つまり、
2. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

特別ページ参照。

1. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☒ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

## 第 III 欄の続き

## 《参考文献》

## 1. J P 3-7576 A

請求の範囲 1-3 に記載された発明と 4-6 に記載された発明は、ともに、「基材と、前記基材上に形成され、細胞を培養する領域であり、かつ細胞と接着性を有する細胞接着層を含有する細胞培養領域とを有する細胞培養用パターンニング基板」であるという点において共通している。

一方、参考文献 1 には、細胞接着性表面および細胞非接着性表面よりなる配列パターンを有することを特徴とする細胞の配列制御用具（すなわち、「細胞培養用パターンニング基板」）が記載され（請求の範囲 1 等参照）、該配列制御用具において、パターン化した細胞接着性表面と細胞非接着性表面とが配列制御用具となる材料（すなわち、「基材」）の表面に形成されることが記載されている（第 2 頁右下欄第 9-12 行等参照）。

してみると、請求の範囲 1-3 に記載された発明と 4-6 に記載された発明は、先行技術に対して貢献する技術的特徴を共有するものとは認められず、単一の一般的発明概念を形成するように関連しているものとは認められない。

よって、この出願には、請求の範囲 1-3 に記載された発明と、請求の範囲 4-6 に記載された発明の、計 2 の発明が包含されているといえる。